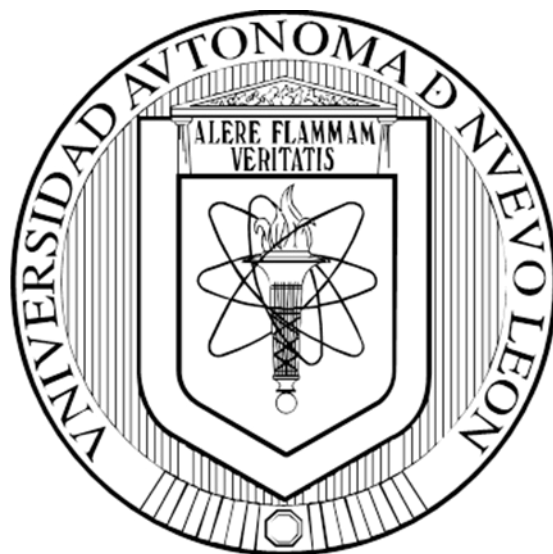


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS NATURALES PARA EL
TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

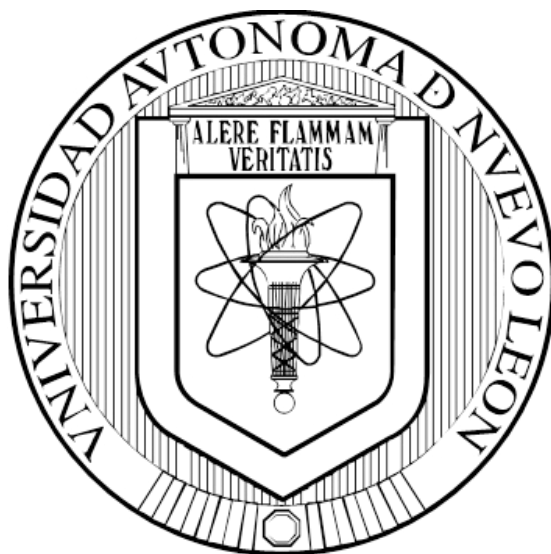
POR

QBP. BRENDA ARMENDÁRIZ BARRAGÁN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA
DE PRODUCTOS NATURALES**

OCTUBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

**NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS NATURALES PARA EL
TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

POR

QBP. BRENDA ARMENDÁRIZ BARRAGÁN

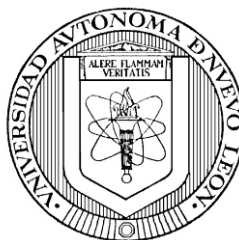
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA
DE PRODUCTOS NATURALES**

OCTUBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



TESIS EN COTUTELA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE NUEVO LEÓN
(MÉXICO)**

Y

**UNIVERSITÉ CLAUDE
BERNARD LYON I
(FRANCIA)**

**NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS NATURALES PARA EL
TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

Por

QBP. BRENDA ARMENDÁRIZ BARRAGÁN

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con
ACENTUACIÓN en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

OCTUBRE, 2017

**NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS NATURALES PARA EL
TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

Comité de Tesis



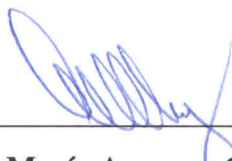
Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Presidente



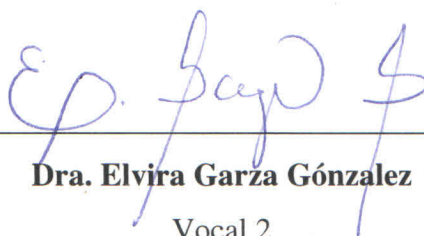
PhD. Hatem Fessi

Secretario



Dra. María Azucena Oranday Cárdenas

Vocal 1



Dra. Elvira Garza González

Vocal 2



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Vocal 3

**NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS
NATURALES PARA EL TRATAMIENTO
DE LA TUBERCULOSIS**

Dirección de Tesis

El presente trabajo fue dirigido por los abajo firmantes dentro de un convenio de colaboración para realizar tesis en cotutela entre la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL) y el *Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés* (UCBL-I), el cual fue firmado en junio del 2013. Como resultado del convenio, la sustentante, Brenda Armendáriz Barragán, obtendrá el grado de Doctor en Ciencias por ambas instituciones.



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Director
UANL-México



Prof. Hatem Fessi
Co-Director
UCBL I-Francia



Dra. Rocío Álvarez Román
Directora Externa
UANL-México



Prof. Abdelhamid Elaissari
Director Externo
UCBL I-Francia

AGRADECIMIENTOS ACÁDEMICOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.



A la Université Claude Bernard Lyon I (Francia) por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de este trabajo en cotutela.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de posgrado (No. 486227).

A la Red Multidisciplinaria de Tuberculosis, SEP-PROMEP 103.5/13/9254.



Al Fondo de CONACyT Ciencia Básica, número 129961.

Al Programme Jeunes Équipes de l'IRD y l'AIIRD, Équipe Nanobiosa, JEAI-2011 (Francia).



Al Programme Avenir Lyon Saint-Etienne (PALSE-2015) por la beca para la estancia de investigación en Francia.

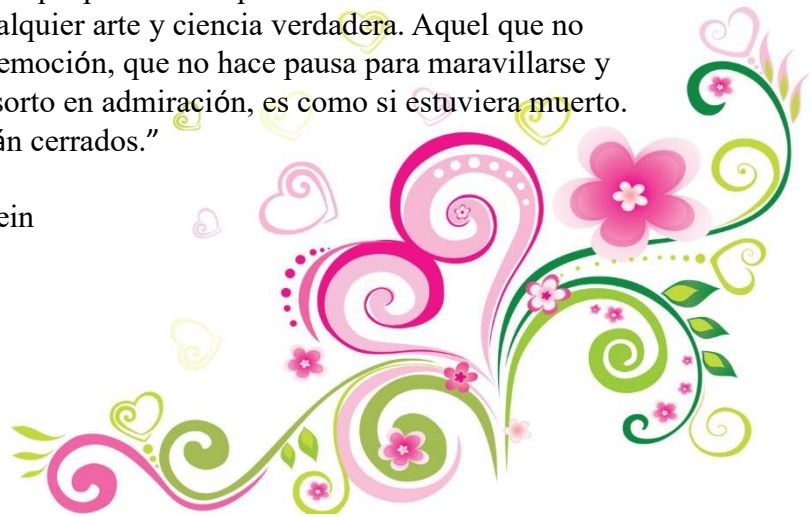
Al Laboratoire d'Automatiques et des Génies de Procédés (LAGEP-CNRS) por el apoyo y facilidades brindadas para la estancia de investigación en Francia.



Al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del Hospital Universitario de la UANL por las facilidades brindadas para las pruebas microbiológicas de este trabajo.

“Lo más bello que podemos experimentar es lo misterioso. Es la fuente de cualquier arte y ciencia verdadera. Aquel que no conoce esta emoción, que no hace pausa para maravillarse y quedarse absorto en admiración, es como si estuviera muerto. Sus ojos están cerrados.”

Albert Einstein



AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A **mi papá**, gracias por ser el primero en creer que lo lograría. Por el amor y la hermosa vida que me brindaste siempre... con todo mi amor para ti, donde quiera que estés.

A **mi mamá**, por ser mi apoyo incondicional. Por escucharme y alentarme a que cumpla mis sueños siempre. Eres parte importante de esto, te amo.

A **mi hermana** y **su esposo**, por apoyar mis decisiones y aventuras. Por tenerme tanta fe y entender mis ausencias. Por el hermoso cariño que me brindan siempre.

A **Samantha**, espero que este trabajo te inspire a lograr tus sueños. Nunca dudes que puedes lograr todo lo que te propongas. Por llegar a demostrarme que una sonrisa tuya también puede ser motor para mi vida. Te amo princesita.

A **mis familiares**, por apoyarme y alentarme a ser mejor cada día. Por estar al pendiente de mi cuando estuve lejos, por entender mis ausencias. Especialmente, a la **familia Barragán Lona**, por su apoyo durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al **Dr. Sergio Galindo**, por confiar en mi este proyecto. Por aceptar el papel de mentor y enseñarme a trabajar y aprender en la ciencia. Por ayudarme a cumplir muchos de mis sueños y por la valiosa amistad que me brinda. Gracias incommensurables.

A la **Dra. Rocío Álvarez**, por aceptar un rol importante en mi formación, por compartir su conocimiento conmigo y por todos sus consejos. Gracias por su bonita amistad y su contribución a lograr mis sueños.

Aux **Professeurs H. Fessi** et **A. Elaissari** de l'UCBL-I, pour votre soutenance et supervision pendant le développement de ce travail en cotutelle, ainsi que, pour l'accueil pendant mon séjour de recherche à Lyon, France. Merci beaucoup à tout **l'équipe LAGEP**.

A mi querido **Nanoteam**, por convertirse en mi segunda familia y por todo lo que me brindaron día a día. Por hacer del Nanolab un hogar. A **Jairo** y **Andrés** por escucharme, aconsejarme y estar al pendiente de mí. A **Larissa** por permitirme aprender a enseñar. A **Marbella**, **Anahí**, **Carolina**, **Heriberto**, **Perlis** e **Ivonne** por brindarme su bonita amistad. Gracias a todos por su cariño; por permitirme ser parte de tan alegre y eficiente equipo de trabajo. Los quiero ver triunfar, siempre.

A **Iván Alanís**, por tu eterna amistad y apoyo. Por todos tus consejos y por alentarme a cumplir mis sueños.

¡GRACIAS TOTALES!

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
Índice de tablas	III
Índice de figuras	IV
Abreviaturas	VI
Resumen	VII
Abstract	VIII
Introducción	1
Justificación del trabajo	4
Hipótesis	5
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	7
Capítulo I: Productos Naturales contra la Tuberculosis	8
I.1 Introducción	9
I.2 Extractos naturales obtenidos de plantas con potencial actividad antituberculosa	10
I.3 Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa	15
I.4 Conclusiones	27
Capítulo II: Nanotecnología aplicada a sistemas de liberación controlada de productos naturales	40
II.1 Introducción	41
II.2 Nanopartículas poliméricas	42
II.3 Nanopartículas sólidas lipídicas	46
II.4 β -Ciclodextrinas	48
II.5 Otros sistemas de liberación nanopartículados	50
Nanoemulsiones	50
Micro/nanocomplejos	50
Nanogeles	50
Niosomas	51
II.6 Conclusiones	51
Capítulo III: Desarrollo de una formulación de nanopartículas con clofazimina y ensayos <i>in vitro</i> contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	57
III.1 Introducción	58
III.2 Materiales	60
III.3 Metodología	60
III.4 Resultados y Discusión	63
III.5 Conclusiones	76
Capítulo IV: Desarrollo y caracterización de nanoformulaciones con extractos de <i>Schinus molle</i> para su aplicación contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	83
IV.1 Introducción	84
IV.2 Materiales	86
IV.3 Metodología	86
IV.4 Resultados y Discusión	92

IV.5 Conclusiones	114
Capítulo V: Conclusiones Generales	122
Capítulo VI: Perspectivas del Trabajo	124
Anexo	126
Resumen Bibliográfico	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
I.1	Extractos naturales obtenidos de plantas con potencial actividad antituberculosa <i>in vitro</i> .	12
I.2	Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa <i>in vitro</i> .	17
III.1	Modificaciones a la técnica de nanoprecipitación para la obtención de las NP biodegradables de PLA cargadas con clofazimina.	64
III.2	Caracterización física de las NP biodegradables blanco y cargadas con clofazimina.	66
III.3	Parámetros de validación establecidos para la cuantificación de CFM por CLAR.	67
III.4	Cuantificación de CFM incorporada en las NP biodegradables.	69
III.5	Determinación de la CMI <i>in vitro</i> para el fármaco libre y las formulaciones de NP (blanco y cargadas) contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	75
IV.1	Análisis de regresión lineal para las curvas de calibración de HMM elaboradas por CLAR para los picos con TR de 28, 38 y 39 min.	88
IV.2	Evaluación cualitativa y de preidentificación fitoquímica por pruebas colorimétricas del extracto HMM.	93
IV.3	Pruebas de solubilidad del extracto HMM en solventes parcialmente miscibles en agua	94
IV.4	Caracterización fisicoquímica de las nanoformulaciones con extracto HMM.	97
IV.5	Actividad antituberculosa del extracto HMM y las nanoformulaciones por la técnica de AMBA en microplaca contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	107
IV.6	Determinación de CL ₅₀ por bioensayo con <i>Artemia salina</i> para el extracto HMM libre y las nanoformulaciones.	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
II.1	Estructura de los dos tipos de nanopartículas poliméricas: A) Nanocápsulas y B) Nanoesfera.	43
II.2	Estructura de una nanopartícula sólida lipídica.	48
II.3	Estructura de la B-Ciclodextrina.	49
III.1	Perfiles calorimétricos para los materiales y las nanoformulaciones por DSC. A) Clofazimina, B) PLA, C) PVA, D) NP-blanco y NP-CFM	70
III.2	Espectros de IR con transformada de Fourier. A) PVA, B) PLA, C) CFM, D) NP blanco y E) NP-CFM.	71
III.3	Perfil de liberación <i>in vitro</i> para las NP biodegradables cargadas con CFM ($n = 2; \bar{x} \pm DS$).	74
IV.1	Perfil cromatográfico obtenido por CLAR para el extracto crudo HMM de <i>Schinus molle</i> .	89
IV.2	Influencia de la cantidad de polímero presente en la fase orgánica sobre el tamaño de nanopartícula ($n = 3; \bar{x} \pm DS$).	95
IV.3	Comparación entre formulaciones en base a la cantidad de polímero utilizada en la fase orgánica y la eficiencia de encapsulación del extracto HMM ($n = 5; \bar{x} \pm DS$).	100
IV.4	Microscopía Electrónica de Barrido de las nanoformulaciones. A) NP PLGA blanco, B) NP PLGA cargadas, C) NP EL100-55 blanco, D) NP EL100-55 cargadas.	101

IV.5	Calorimetría Diferencial de Barrido para las nanoformulaciones elaboradas con PLGA. A) PLGA, B) PVA, C) Extracto HMM, D) NP PLGA blanco, E) NP PLGA cargadas.	102
IV.6	Calorimetría Diferencial de Barrido para las nanoformulaciones elaboradas con EL100-55. A) EL100-55, B) PVA, C) Extracto HMM, D) NP EL100-55 blanco, E) NP EL100-55 cargadas.	103
IV.7	Análisis por Espectroscopía FT-IR de los materiales utilizados en las nanoformulaciones. A) PVA, B) PLA, C) PLGA, D) EL100-55, E) Extracto HMM	104
IV.8	Análisis por Espectroscopía FT-IR de las nanoformulaciones. A) NP PLA blanco, B) NP PLA cargadas, C) NP PLGA blanco, D) NP PLGA cargadas, E) NP EL100-55 blanco, F) NP EL100-55 cargadas.	106
IV.9	Perfil de liberación para las nanoformulaciones cargadas (durante 28h) ($n = 2; \bar{n} \pm DS$).	110
IV.10	Esquema representativo de la liberación de extracto HMM a partir de las nanoformulaciones elaboradas.	112
IV.11	Porcentaje de citotoxicidad del extracto HMM libre y nanoencapsulado por hemólisis inducida en eritrocitos humanos ($n = 3; \bar{x} \pm DS$).	113

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Absorbancia	Abs
Ácido poliláctico	PLA
Ácido poli(láctico- <i>co</i> -glicólico)	PLGA
Área bajo la curva	ABC
Azul de alamar	AMBA
Calorimetría Diferencial de Barrido	DSC
Clofazimina	CFM
Cromatografía de líquidos de alta resolución	CLAR
Etambutol	ETO
Eudragit L100-55	EL100-55
Índice de polidispersidad	IPD
Infrarrojo	IR
Isoniazida	INA
Microscopía Electrónica de Barrido	MEB
Nanopartículas poliméricas	NP
Pirazinamida	PZA
Rifampicina	RIF

RESUMEN

La tuberculosis es una infección crónica localizada principalmente en los pulmones durante las etapas tempranas de la enfermedad. La Organización Mundial de la Salud, anualmente, registra alrededor de 9 millones de casos nuevos y 1.5 millones de muertes. Aunado a las altas incidencias, el desarrollo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multifarmacorresistentes ha venido a complicar más el panorama mundial de control de la enfermedad. Con el objetivo de contrarrestar esta epidemia, uno de los aspectos con mayor área de oportunidad es el empleo de sistemas de liberación controlada, ya sea, para los fármacos utilizados dentro de los esquemas terapéuticos establecidos, o para la formulación de productos naturales (i.e. extractos naturales) con buen potencial para su aplicación como coadyuvantes dentro de los tratamientos de la tuberculosis. En el presente estudio, en primera instancia, se trabajó sobre el diseño y desarrollo de una nanomedicina a base de nanopartículas biodegradables y un fármaco antituberculoso (clofazimina); en segunda instancia, se diseñaron y desarrollaron coadyuvantes a partir de nanopartículas y extractos naturales obtenidos de *Schinus molle*. En ambos casos se buscó, como objetivo principal, que estas nanoformulaciones incrementaran el potencial antituberculoso de los activos incorporados y permitieran una aplicación segura de los extractos por diversas vías de administración. De manera general, la caracterización de las nanoformulaciones permitió establecer una relación directa entre las propiedades fisicoquímicas (i.e. el tamaño de partícula, la carga superficial y el perfil de liberación) de las nanopartículas poliméricas cargadas con los activos (fármaco o extracto) y el incremento de la actividad antituberculosa *in vitro*. En el caso particular de las nanoformulaciones de extracto, pruebas *in vitro* adicionales mostraron que la nanoencapsulación del producto natural disminuyó la toxicidad en comparación con una aplicación libre del mismo. En conclusión, éstas nanoformulaciones cargadas con clofazimina o extracto de *S. molle* mostraron tener un alto potencial para ser aplicadas dentro de un esquema terapéutico eficiente para el tratamiento de la tuberculosis.

ABSTRACT

Tuberculosis is a chronic infection located in the lungs during the early stages of this disease. The World Health Organization, annually, registers about 9 million new cases and 1.5 million deaths. In addition, the development of multi-drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* has complicated the global control of tuberculosis. An effective control for this epidemic can be based on two main pharmaceutical strategies. First, the development of novel formulations based on controlled release systems for antitubercular drugs which could be used for establishing more effective therapeutic schemes. A second approach can be focused on development of natural products nanoformulations (e.g. natural extracts) for their application as adjuvants for tuberculosis treatment. In this context, the present research work was focused on the design and development of a nanomedicine based on biodegradable nanoparticles and an antitubercular drug of second line (clofazimine). In addition, organic extracts obtained from *Schinus molle* were formulated into nanoparticles in order to use them as adjuvants in tuberculosis treatment. The characterization of the nanoformulations established a direct relationship between the physicochemical properties (i.e. particle size, surface charge and release profile) of the active-loaded polymeric nanoparticles (with drug or extract) and the increase of the antitubercular activity *in vitro*. Particularly, additional *in vitro* tests showed that nanoencapsulation of *S. mole* extract decreased their toxicity as compared to a non-encapsulated extract. In conclusion, nanoformulations loaded with clofazimine or extract of *S. molle* showed to have a high potential to be applied in efficient therapeutic schemes for tuberculosis treatment.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la tuberculosis (TB) es la segunda enfermedad infecciosa a nivel mundial con mayor prevalencia e índice de mortalidad anual. La Organización Mundial de la Salud (OMS), recientemente dio a conocer su nueva estrategia “Un mundo libre de tuberculosis” para la prevención, el control y la erradicación de la TB, con miras a cumplirse en su totalidad para el año 2035. Dentro de los objetivos específicos de dicha estrategia, la OMS fomenta la búsqueda de nuevos conocimientos e innovaciones científicas que mejoren e incrementen la eficiencia de los tratamientos que se siguen contra la enfermedad.

Dos de las estrategias farmacéuticas que más se han estudiado durante los últimos años con el objetivo principal de incrementar la eficiencia global de los regímenes terapéuticos empleados en la TB son, por un lado, la incorporación de fármacos antituberculosos de primera y segunda línea en sistemas de liberación controlada, particularmente, nanopartículas poliméricas (NP), y por otro, el empleo de productos naturales (p.e. extractos o compuestos aislados) como coadyuvantes, es decir, sustancias que al ser administradas en conjunto con los fármacos existentes, aumenten la actividad de éstos.

En este contexto, a lo largo de este trabajo de investigación se buscó abordar y desarrollar dos estrategias de tratamiento específico para la TB. En primera instancia, se diseñó y desarrolló una nanomedicina a base de NP biodegradables y un fármaco antituberculoso de segunda línea, la clofazimina (CFM). En segundo lugar, se diseñaron y desarrollaron coadyuvantes a partir de NP (biodegradables y no biodegradables) y extractos naturales obtenidos de *Schinus molle*; en esta última estrategia se tenía como objetivo principal que dichas nanoformulaciones incrementaran el potencial antituberculoso de los activos incorporados y permitieran una aplicación segura de los mismos por diversas vías de administración (p.e. intravenosa, pulmonar u oral).

Considerando lo anterior, en el Capítulo I se aborda el estudio de diversos productos naturales con potencial actividad antituberculosa. El segundo Capítulo proporciona un panorama general de la formulación de productos naturales en sistemas particulados, enfocándonos en el uso de formulaciones elaboradas a partir de NP y extractos naturales.

El Capítulo III describe el diseño y desarrollo de una nanomedicina a partir de NP biodegradables y un fármaco de segunda línea, la clofazimina. Posteriormente, el Capítulo IV aborda el diseño y desarrollo de nanoformulaciones a partir de NP biodegradables y no biodegradables con extracto metanólico obtenido de la hoja de *Schinus molle*, las cuales podrían emplearse como coadyuvantes en el tratamiento de la TB. Finalmente, las conclusiones y perspectivas del trabajo se detallan en los Capítulos V y VI, respectivamente.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La TB es una enfermedad con altísimas tasas de incidencia y número de muertes. Aunado a esto, el desarrollo de cepas de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes complican la atención y seguimiento de la infección. En este sentido, diversas organizaciones de salud pública nacionales e internacionales señalan la gran importancia y problema de salud que representa la TB en todo el mundo. Recientemente, la OMS dio a conocer su estrategia “Un mundo sin tuberculosis”, en la cual señala de manera puntual la necesidad de generar nuevo conocimiento científico e innovaciones que permitan eficientizar el tratamiento que se sigue en la enfermedad. En este contexto, el desarrollo de nanomedicinas a base de NP y fármacos existentes, o el desarrollo de coadyuvantes en nanoformulaciones representan dos de las opciones más innovadoras y prometedoras para dicho fin. Así, en el presente trabajo de investigación, se propuso, por un lado, la elaboración de una formulación de NP biodegradables con un fármaco de segunda línea (clofazimina) con potencial aplicación dentro de los esquemas terapéuticos que se tienen establecidos contra la TB; por otro lado, se desarrollaron formulaciones a partir de NP y extractos naturales obtenidos de *Schinus molle* para su potencial aplicación oral, intravenosa o pulmonar, las cuales podrían ser empleadas como coadyuvantes en el tratamiento de la TB.

HIPÓTESIS

La encapsulación de un extracto natural (*Schinus molle* L.) y de un fármaco antituberculoso (clofazimina) en nanopartículas poliméricas potenciará su actividad antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar, elaborar y evaluar la actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* de nanopartículas poliméricas que contengan al fármaco clofazimina y/o el extracto de *Schinus molle* L. para determinar su potencial uso en los esquemas de tratamiento de la tuberculosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener extractos de *Schinus molle* L. por método de soxhlet/maceración y realizar su caracterización fitoquímica y fisicoquímica.
2. Desarrollar formulaciones con el extracto de *Schinus molle* L. en nanopartículas poliméricas y caracterizarlas fisicoquímicamente en función de la medición de tamaño de partícula e índice de polidispersidad, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación, perfil calorimétrico, perfil de liberación *in vitro*, análisis por espectroscopía de infrarrojo y microscopía electrónica de barrido.
3. Diseñar, desarrollar y caracterizar una formulación del fármaco clofazimina en nanopartículas poliméricas y caracterizarla fisicoquímicamente en función de la medición de tamaño de partícula e índice de polidispersidad, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación, perfil calorimétrico, perfil de liberación *in vitro* y análisis por espectroscopía de infrarrojo.
4. Evaluar la actividad antibacteriana contra *M. tuberculosis* de las formulaciones de nanopartículas poliméricas (con fármaco o extracto) por medio de la técnica de azul de alamar.
5. Evaluar la actividad citotóxica de los productos naturales y sus nanoformulaciones por medio de la determinación de la CL₅₀ utilizando el modelo de *Artemia salina* y el índice de citotoxicidad por el ensayo de hemólisis en eritrocitos humanos.

CAPÍTULO I:

PRODUCTOS NATURALES CONTRA LA TUBERCULOSIS

PRODUCTOS NATURALES CONTRA LA TUBERCULOSIS

1.1 Introducción

Históricamente, la TB ha sido una de las infecciones más antiguas. La TB es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, y se contagia por medio del aire. Afecta principalmente los pulmones; no obstante, otros órganos pueden verse comprometidos durante la enfermedad (Bhatia, Sujata K., 2010).

Mundialmente, la TB continúa siendo una de las principales infecciones, afectando alrededor de 9 millones de personas y causando la muerte de al menos 2 millones al año (World Health Organization, 2017a). Particularmente, México es uno de los países con mayor prevalencia en Latinoamérica, registrando alrededor de 16,913 casos nuevos y 2,125 muertes anuales (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades - CENAPRECE, 2017).

El tratamiento de la TB incluye el uso de múltiples fármacos de primera línea que incluyen a la rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), isoniazida (INA) y etambutol (ETO) durante un período prolongado de tiempo, que va de los 6 meses hasta los 2 años (Horsburgh, Barry, & Lange, 2015). Debido a lo anterior, el régimen terapéutico para el control de la TB se torna de carácter altamente estricto (World Health Organization, 2017b). Además, el uso indiscriminado de antibióticos sin la vigilancia médica adecuada y el abandono del tratamiento por parte del paciente ha generado a su vez, una problemática importante, el desarrollo de cepas de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes (MT-MDR) (American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention, & Diseases Society of America, 2003).

Las cepas de MT-MDR a los fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la TB están ampliamente distribuidas en todo el mundo (World Health Organization, 2016). En pacientes que presentan infecciones a causa de ésta clase de cepas se opta por utilizar fármacos antituberculosos de segunda línea, los cuales incrementan de sobremanera el costo del tratamiento global y presentan una serie de efectos adversos más severos (Laurenzi, M., Ginsberg, A., & Spigelman, M., 2007). En conjunto, este tipo de microorganismos dificultan aún más el tratamiento y la erradicación completa de la TB

en todo el mundo, por lo que, la problemática se ha convertido en un aspecto prioritario dentro de los esquemas de salud pública para instituciones como la OMS, la cual, recientemente dio a conocer su estrategia mundial “*Un mundo libre de tuberculosis*” con miras a ser cumplida para el año 2035. La estrategia hace énfasis en la generación de nuevos conocimientos científicos e innovaciones que permitan mejorar los esquemas terapéuticos para el tratamiento de dicha infección (World Health Organization, 2017c).

Por su parte, los productos naturales han jugado un rol importante en el desarrollo de terapias clínicas para diversas infecciones. Muchos de los fármacos comúnmente utilizados son derivados de un producto natural. El descubrimiento del fármaco antimalárico artemisinina y el agente anticancerígeno taxol, establecen la importancia de las plantas en el descubrimiento de nuevos fármacos (Lahlou, 2013). Particularmente, en materia de la TB, dos de los principales fármacos utilizados en el tratamiento, la RIF y la INA, son los compuestos sintéticos derivados de productos naturales, la nicotinamida (amida de la vitamina B₃) y la rifamicina, respectivamente (Maggi, Pasqualucci, Ballotta, & Sensi, 1966). Sólo una pequeña proporción de especies vegetales han sido investigadas formalmente debido a sus propiedades medicinales, por lo que, esta área de estudio representa una fuente prometedora de nuevos agentes terapéuticos contra la TB (Negi, Kumar, Luqman, Saikia, & Khanuja, 2010). De manera puntual, dos de los productos naturales que se han estudiado con mayor interés son los extractos naturales y sus metabolitos secundarios aislados con potencial actividad antituberculosa, los cuales son obtenidos en su mayoría de plantas.

En particular, en este capítulo se aborda una revisión bibliográfica detallada, tanto de extractos naturales, como de compuestos aislados de plantas con potencial actividad antituberculosa.

1.2 Extractos naturales obtenidos de plantas con potencial actividad antituberculosa

Un buen número de extractos naturales obtenidos de plantas, microorganismos y organismos marinos han exhibido importante actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis*. La Tabla I.1 muestra diferentes estudios de extractos vegetales que fueron evaluados en base a su potencial para inhibir diferentes cepas de *M. tuberculosis*. En la Tabla se detalla el nombre científico de la planta, el tipo de extracto (en base al solvente utilizado para su

elaboración), la cepa empleada del microorganismo y la actividad antituberculosa *in vitro* (CMI).

Particularmente, los extractos naturales obtenidos de plantas se han vuelto un aspecto importante a estudiar como fuente potencial de tratamientos contra la TB. Dentro de los diversos estudios realizados hasta el momento, los extractos de *Actiniopteris radiata*, *Allium sativum*, *Aristolochia brevipes*, *Callophyllum brasiliense*, *Cassia fistula*, *Leucas marrubiioides*, *Quercus infectoria* y *Syzygium aromaticum* han presentado una prometedora CMI contra cepas de *M. tuberculosis*, obteniendo valores por debajo de los 25 µg/ml, lo que los coloca como fuentes importantes de compuestos con actividad antituberculosa, los cuales, podrían ser empleados dentro de nuevos esquemas terapéuticos para ésta importante enfermedad.

Tabla I.1. Extractos naturales obtenidos de plantas con potencial actividad antituberculosa *in vitro*.

Planta	Parte utilizada	Solvente de extracto	Cultivo (cepa)	CMI (µg/ml)	Ref.
<i>Actinopteris radiata</i> Linn.	Toda la planta	Hexano, Cloroformo y Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5, 3.125 y 25, respectivamente.	Munna <i>et al.</i> , 2014
<i>Allium sativum</i>	Bulbo	Dietil éter	<i>M. tuberculosis</i>	0.5	Jain, 1998
<i>Alnus rubra</i> Bong	Corteza	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Alstonia scholaris</i>	Fruto y Corteza	Butanol	<i>M. tuberculosis</i>	500 y 100, respectivamente.	Antony <i>et al.</i> , 2012
<i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) ex Standl.	Corteza	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	50	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005
<i>Andrographis paniculata</i>	Toda la planta	Hexano/Metanol (1:5)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (sensible y MDR)	250	Prabu <i>et al.</i> , 2015
<i>Aristolochia brevipes</i> Benth.	Rizoma	Diclorometano	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Navarro-García, Luna-Herrera, Rojas-Bribiesca, Álvarez-Fitz, & Ríos, 2011
<i>Aristolochia taliscana</i> Hook. & Arn.	Raíz	Hexano	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	50	León-Díaz <i>et al.</i> , 2010
<i>Balsoamorrhiza sagittata</i> Pursh Nutt	Raíz	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Bidens pilosa</i> L.	Hoja	Etanol	<i>M. tuberculosis</i>	100	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Callophyllum brasiliense</i> Cambess.	Hoja	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	3.02	Gomez-Cansino <i>et al.</i> , 2015
<i>Cassia fistula</i> Linn.	Raíz	Etanol (95%)	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Channabasappa, Shrinivas, & Venkatrao, 2015
<i>Chaenactis douglasi</i> Hook	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Chrysactinia mexicana</i> A. Gray	Raíz	NE	<i>M. tuberculosis</i> (resistente)	62.5	Molina-Salinas <i>et al.</i> , 2007
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Cáscara de fruto	Hexano	<i>M. tuberculosis</i> (resistente INA y ETO)	25 y 50, respectivamente.	Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2008

<i>Empetrum nigrum</i> L.	Vástago	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Erigeron strigosus</i> Muhl.	Raíz	Diclorometano	<i>M. tuberculosis</i>	100	Cantrell, Fischer, Urbatsch, McGuire, & Franzblau, 1998
<i>Geum macrophyllum</i> Wild. var. <i>macrophyllum</i>	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Glehnia littoris</i> F. Schmidt ssp	Raíz	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Heracleum maximum</i> Bartr.	Raíz	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Hypericum elodes</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-50	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypericum foliosum</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-50	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypericum grandifolium</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-51	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypericum hircinum</i> subsp. <i>majus</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-52	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Hypericum humisufum</i>	Aérea	Etanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA, RIF, ETO)	25-53	Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<i>Inula helenium</i> L.	Raíz	Diclorometano/Hexano	<i>M. tuberculosis</i>	100	Cantrell <i>et al.</i> , 1998
<i>Juniperus communis</i> L.	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Larrea divaricata</i> Cav.	NE	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	50	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005
<i>Leucas marrubioides</i>	Raíz	Éter de petróleo, Cloroformo y Metanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5, 50 y 100, respectivamente.	Gowrish, Vagdevi, & Rajashekar, 2015
<i>Lomatium dissectum</i> Nutt	Raíz	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997

<i>Magnolia acuminata</i>	Corteza	Diclorometano	<i>M. tuberculosis</i>	100 (disco)	Cantrell <i>et al.</i> , 1998
<i>Moneses uniflora</i> L.	Aérea	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Nuphar lutea</i> L.	Rizoma	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Olea europaea</i> L.	Hoja	Hexano	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (resistente INA)	25	Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2008
<i>Oplopanax horridus</i> Smith Miq.	Corteza interior	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	10 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Quercus infectoria</i>	Semilla	Éter de petróleo, Cloroformo y Metanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5, 50 y 100, respectivamente.	Sheeba, Gomathi, & Citarasu, 2015
<i>Panax ginseng</i>	Raíz	Metanol, Etanol, Éter	<i>M. tuberculosis</i>	500, 500 y 100, respectivamente.	Chang, Tasaka, Kuwabara, Watanabe, & Matsuo, 1979
<i>Persea americana</i> Mill.	Hoja	Hexano	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv	125 y 62, respectivamente.	Gomez-Flores <i>et al.</i> , 2008
<i>Phoradendron coryae</i>	NE	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	50	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005
<i>Phoradendron tomentosum</i>	NE	Diclorometano/Metanol (1:1)	<i>M. tuberculosis</i>	50	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005
<i>Pinus contorta</i>	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
<i>Piper nigrum</i> L.	Semilla	Acetona	<i>M. tuberculosis</i> (sensible y MDR)	100	Kaur & Kaur, 2015
<i>Populus tremuloides</i>	NE	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	50 (disco)	McCutcheon <i>et al.</i> , 1997
Propóleo	Resina	Metanol	<i>M. tuberculosis</i>	128	Valcic <i>et al.</i> , 1999
<i>Punica granatum</i>	Fruto	Metanol	<i>M. tuberculosis</i> (MDR y XDR)	64 y 512, respectivamente.	Dey, Ray, & Hazra, 2015
<i>Syzygium aromaticum</i>	Brotes	Metanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0.8	Kaur & Kaur, 2015
<i>Urtica dioica</i>	Hoja	Metanol	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	250	Singh, Hussain, Verma, & Sharma, 2013

NE= No Especificado.

1.3 Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa

Diversos compuestos naturales antituberculosos han sido aislados a partir de plantas distribuidas por todo el mundo. Dichos compuestos naturales pueden ser empleados no sólo como agentes antituberculosos dentro de un esquema terapéutico, sino también, pueden ser la estructura base para modificaciones químicas y estructurales que permitan incrementar la actividad biológica de interés. En la Tabla II se muestra una revisión bibliográfica exhaustiva, presentando los principales compuestos aislados a partir de plantas. Se detalla el tipo de compuesto evaluado, fuente de obtención (planta), cepa empleada del microorganismo y la actividad antituberculosa *in vitro* mostrada contra *M. tuberculosis*.

Diversos compuestos aislados de plantas han demostrado CMI contra cepas sensibles de *M. tuberculosis* por debajo de los 10 µg/ml. Como ejemplos, podemos mencionar algunos alcaloides como la N-oxido oiridina y la bidebilina E aislados de *Allium stipitatum* y *Polyalthia cerasoides*, respectivamente, que han mostrado actividad contra la cepa H37Rv. Por su parte, el artocarpin y artonin F aislados del género *Artocarpus* presentan importante actividad contra la cepa H37Ra. Las beilschmina B y D, obtenidas de *Beilschmiedia tsanguui* presentaron actividad antituberculosa importante (CMI=2.5 y 7.5 µg/ml, respectivamente) contra aislados clínicos de *M. tuberculosis* (cepa 90-221387). Compuestos flavonoides obtenidos de *Derris indica* presentan una CMI de 6.25 µg/ml contra *M. tuberculosis* H37Rva. La feruitiramina (*Litsea hypophaea*) inhibe a *M. tuberculosis* a una concentración de 1.6 µg/ml. Además, diversos sesquiterpenos aislados de *Camchaya calcarea* (p.e. goyazansólido, centraterino, lichnoforolido B, isocentraterino, entre otros) presentaron actividad antituberculosa igualmente importante.

Por su parte, otros compuestos aislados han demostrado actividad antituberculosa similar a fármacos antituberculosos contra cepas sensibles. Por ejemplo, el etil p-metoxicinamato (*Kaempferia galanga*) mostró una CMI *in vitro* de 0.485 y 0.242 mM contra las cepas H37Ra y H37Rv, respectivamente. La α-mangostina (*Garcinia mangosta*) presentó una CMI=15.24 µM contra tuberculosis. De manera relevante, especies del género *Rumex* contienen compuestos como el rumexmepósido A, la toracrisona y otros glucopiranosidos, los cuales han presentado CMI de 4.1 a 26.6 µM contra *M. tuberculosis* H37Rv. Por su

parte, compuestos como el mutagino, el orbiculino G y el tripogelino G-2 aislados de *Microtropis fokienensis* mostraron CMI en orden de micromoles contra la cepa 90-221387 (aislado clínico). Esteroides como la β -sitostenona (*Radermachera boniana*) presentó una CMI=39.5 μ M contra H37Rv.

Particularmente, los compuestos aislados con importante actividad antituberculosa en cepas MDR son de gran interés. Así, la bisnordihidroxi-ferina (*Strychnos mitscherlichii*) presentó una CMI=6.25 μ g/ml contra *M. tuberculosis* H37Rv MDR. De igual manera, el diterpeno 7 α -acetoxi-6 β -hidroxileanona (*Plectranthus grandidentatus*) mostró una CMI=3.12 μ g/ml contra la misma cepa.

Cabe mencionar, que la principal ventaja de tener compuestos aislados de fuentes naturales bien definidos (química y estructuralmente) con actividad antituberculosa importante es que su síntesis química y producción a gran escala se vuelve potencialmente viable en un período corto de tiempo y, por lo tanto, su formulación y comercialización dentro de esquemas terapéuticos de la TB representa un área de oportunidad relevante para las industrias farmacéuticas.

Tabla I.2. Compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa *in vitro*.

Tipo de Compuesto	Nombre de Compuesto	Planta	Cultivo (cepa)	CMI (µg/ml)	Ref.
ALCALOIDES	N-oxido piridina	<i>Allium stipitatum</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1.25	O'Donnell <i>et al.</i> , 2009
	6-metoxidihidrochelirubina	<i>Bocconia arborea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2009
	6-metoxihidrocheleritrina				Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2009
	3-formilcarbazol	<i>Clausena excavata</i>	<i>M. tuberculosis</i>	100	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	3-methoxicarbonilcarbazol			50	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	2-hidroxi-3-formil-7-metoxicarbazol			100	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	Clausolina J			100	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	7-hidroximuconal	<i>Clausena harmandiana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Thongthoom, Songsiang, Phaosiri, & Yenjai, 2010
	Criptolepina HCl	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	<i>M. tuberculosis</i>	100	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	(-)-Nordicentrina	<i>Goniothalamus laoticus</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5	Lekphrom, Kanokmedhakul, & Kanokmedhakul, 2009
	4-metoxi-2-fenilquinolina	<i>Lunasia amara</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	16	Aguinaldo <i>et al.</i> , 2007
	Graveolina				
	Kokusagina				
	Bisnordihidroxiiferina	<i>Strychnos trinervis</i>	<i>M. tuberculosis</i> 607 IA-82	30-40	Melo, Santos, Chiappeta, de Mello, & Mukherjee, 1987
	Bisnordihidroxiiferina	<i>Strychnos mitscherlichii</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y MDR	12.5 y 6.25, respectivamente	Aponte <i>et al.</i> , 2008
	Sarmentina	<i>Piper sarmentosum</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	50	
	Pirrolidina			25	

	Sarmentosina			50	Tuntiwachwuttikul, Pha Insa, Pootaeng-On, & Taylor, 2006a
	Braquiamida			50	
	Pelitorina			50	
	Braquistamida B			50	
	Bidebilina E	<i>Polyalthia cerasoides</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.25	Kanokmedhakul, Kanokmedhakul, & Lekphrom, 2007
	Liriodenina	<i>Pseuduvaria setosa</i>	<i>M. tuberculosis</i>	12.5	Wirasathien, Boonarkart, Pengsuparp, & Suttisri, 2006
	Oxostefanina			50	Wirasathien <i>et al.</i> , 2006
	Dictamina	<i>Zanthoxylum wutaiense</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	30	Huang, Ishikawa, Peng, Tsai, & Chen, 2008
	γ-Fagarina				
FLAVONOIDES, CUMARINAS, CROMONAS, CHALCONAS, FENOLES Y QUINONAS	Artocarpin	<i>Artocarpus altilis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	3.12	S. Boonphong, Baramee, Kittakoop, & Puangsombat, 2007
	Chaplasin				
	Flavonoides (NN)	<i>Artocarpus rigidus</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5-50	Namdaung <i>et al.</i> , 2006
	Artonin F			6.25	
	Artoindone-cianin C			12.5	
	Artonol B			100	
	4α-5α-epoxybeilschmina A	<i>Beilschmiedia tsangii</i>	<i>M. tuberculosis</i> 90-221387	30	Chen, Chou, Peng, Chen, Yang, <i>et al.</i> , 2007
	4α-5α-epoxybeilschmina B			40	
	Beilschmina A			50	
	Beilschmina B			2.5	
	Beilschmina D			7.5	
	Dihidromonospermosido	<i>Butea monosperma</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25-100	Chokchaisiri <i>et al.</i> , 2009
	Flavonoides (NN)				

	Dentatina	<i>Clausena excavata</i>	<i>M. tuberculosis</i>	50	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	Nor-dentatina			100	Sunthitikawinsakul <i>et al.</i> , 2003
	Puncicalagina	<i>Combretum molle</i>	<i>M. tuberculosis</i>	0.6	Asres <i>et al.</i> , 2001
	Demetoxicurcumina	<i>Curcuma longa</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	200	Agrawal <i>et al.</i> , 2008
	Pinocembrina	<i>Dalbergia parviflora</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5	Songsiang <i>et al.</i> , 2009
	Dalparvona			50	
	Dalparvineno			50	
	Flavonoides (NN)	<i>Derris indica</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.25-25	Koysomboon, van Alena, Kato, & Chantrapromma, 2006
	Demetoxicanugina			50	
	3,7-dimetoxiflavona			50	
	Laqueolatina B			50	
	Mackiaina			50	
	Caranjacromeno			12.5	
	Pinatina			12.5	
	Conclonginol A	<i>Eriosema chinense</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Sutthivaiyakit <i>et al.</i> , 2009
	Conclonginol B			50	
	Conclonginol H			25	
	Lupinifolinol			25	
	Dehidrolupinifolinol			12.5	
	Flemiquina			12.5	
	Eriosemaona A			12.5	
	Lupinifolina			12.5	
	Flavonoides varios	<i>Erythrina stricta</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5-50	Rukachaisirikul, Saekee, Tharibun, Watkuolham, & Suksamrarn, 2007
	Espoletina	<i>Fatoya pilosa</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	18	

	Isobavachalcona			18	Chiang, Cheng, Peng, Huang, & Chen, 2010
	Bifenilos (NN)	<i>Garcinia linnii</i>	<i>M. tuberculosis</i> 90-221387	50	Chen, Peng, Huang, & Chen, 2006
	Xantonas (NN)			52.3	
	Glabridin	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y H37Ra	29.16	Gupta <i>et al.</i> , 2008
	Perforamono B	<i>Harrisonia perforata</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Tuntiwachwuttikul, Phansa, Pootaeng-On, & Taylor, 2006b
	Perforamono D			25	
	Chaconas (NN)	<i>Helichrysum melanacme</i>	<i>M. tuberculosis</i>	0.05	Lall, Hussein, & Meyer, 2006
	Etil p-metoxicinamato	<i>Kaempferia galanga</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	0.485 mM	Lakshmanan <i>et al.</i> , 2011
			<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0.242 mM	
	Malabaricona A	<i>Knema glauca</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Rangkaew, Suttisri, Moriyasu, & Kawanishi, 2009
	Dodecanoilfloroglucinol			50	
	Feruloitiramina	<i>Litsea hypophaea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1.6	Pan <i>et al.</i> , 2010
	Quinona (NN)	<i>Psychotria camponutans</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Solis <i>et al.</i> , 1995
	Plicatina B	<i>Senecio mathews</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	32	Hong, Minter, Franzblau, & Reinecke, 2008
	Cromeno werneria			50	
	Aloe-emodina	<i>Stephania dinklagei</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	6.25	Camacho, Kirby, Warhurst, Croft, & Phillipson, 2000; Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2009
	Pinostrobina	<i>Teloxis graveolens</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2009
XANTONAS, NAFTALENOS, QUINONAS,	Desacetilpiramidaglaina D	<i>Aglaia forbesii</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Joycharat, Greger, Hofer, & Saifah, 2007
	Bauhinoxepina J	<i>Bauhinia purpurea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	24	Boonphong <i>et al.</i> , 2007

ANTRACENOS Y ANTRAQUINONAS	Eritrofloin C	<i>Beilschmiedia erythrophloia</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	50	Yang, Cheng, Peng, Chen, & Chen, 2009
	Globiferina	<i>Cordia globifera</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.2	Dettrakul, Surerum, Rajviroongit, & Kittakoo, 2009
	Cardiacromo C			1.5	
	Cardiacromo B			12.5	
	Eretiquinona	<i>Ehretia longiflora</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	25	Chien, Peng, Lin, Chen, & Tsai, 2010
	Engelarquinona	<i>Engelhardia roxburghiana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	20	Lin <i>et al.</i> , 2005; Wu <i>et al.</i> , 2007
	2-metoxijuglona			30	
	3-metoxijuglona			3.125	
	7-metiljuglona	<i>Euclea natalensis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, WC64/02, WH51/02	0.5	Bapela, Lall, Fourie, Franzblau, & Van Rensburg, 2006
	α -mangostina	<i>Garcinia mangosta</i>	<i>M. tuberculosis</i>	15.24 μ M	Arunrattiyakorn, Suksamrarn, Suwannasai, & Kanzaki, 2011
	(+)-altolactona	<i>Goniiothalamus laoticus</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.25	Lekphrom <i>et al.</i> , 2009
	Howiinin A				
	Perforamona B	<i>Harrisonia perforata</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Tuntiwachwuttikul <i>et al.</i> , 2006b
	Perforamona D			25	
	Peucin-7-metileter			50	
	Greveicromenol			50	
	Litsecolido L	<i>Litsea hypophaea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	25	Pan <i>et al.</i> , 2010
	α -tocospiro A	<i>Parashorea lucida</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	30	Chen <i>et al.</i> , 2010
	α -tocospiro B			50	
	α -tocopherilquinona			25	
	Rumexnepósido A	<i>Rumex nepalensis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	20.7 μ M	Liang <i>et al.</i> , 2010
	Toracrisona	<i>Rumex hastatus</i>		6.1 μ M	

	Nepodin-8-O-β-D-glucopiranosido			26.6 μM	
	Toracrisona-8-O-β-D-glucopiranosido			8.9 μM	
	Crisofanol-8-O-β-D-glucopiranosido			4.1 μM	
ALCANOS, ÁCIDOS GRASOS ACETILÉNICOS Y CADENA- RAMIFICADOS	Polino	Angelica sinensis	M. tuberculosis H37Rv	25.3	Deng <i>et al.</i> , 2008
	Cerebrosido (NN)	Euphorbia platyphyllos	M. tuberculosis H37Rv	40	Cateni, Zilic, & Zacchigna, 2008
	Ácido exocárpico	Exocarpus latifolius	M. tuberculosis H37Ra	20	Koch <i>et al.</i> , 2009
	Antihelminticina A	Hydnocarpus anthelmintica	M. tuberculosis H37Rv	5.54	Wang <i>et al.</i> , 2010
	Antihelminticina B			16.7	
	Antihelminticina C			4.38	
	Ácido chaulmoogrico			9.82	
	Etil chaulmoogrico			16.8	
	Ácidos 11-hidroxihexadecanoicos (ácido tiriantínico 1, 2, 8, 9)	Ipomoea tyrianthina	M. tuberculosis	25	León-Rivera <i>et al.</i> , 2008
	γ-lactona micrólido (-)-(NN)	Micromelum hirsutum	M. tuberculosis	1.5	Ma <i>et al.</i> , 2005
	Oplopandiol polino	Oplopanax horridus	M. tuberculosis H37Ra	61.5	Inui <i>et al.</i> , 2010
			M. tuberculosis H37Rv	50.2	
	Ácido octadeca-9,11,1-trinóico	Polyalthia cerasoides	M. tuberculosis H37Ra	6.25	Kanokmedhakul <i>et al.</i> , 2007
	Debilisona B	Polyalthia debilis	M. tuberculosis H37Ra	25	Panthama, Kanokmedhakul, & Kanokmedhakul, 2010
	Debilisona C			12.5	
	Debilisona E			25	
	Poliacetileno furanoide	Polyalthia evecta	M. tuberculosis H37Ra	6.25	Panthama <i>et al.</i> , 2010

AROMÁTICOS SIMPLES, CROMENOS Y BENZOFURANOS		Alliodorin	Cordia globifera	M. tuberculosis	12.5	Dettrakul et al., 2009
		Elaeagina				
		Cordiacromeno				
		Alcano aromático (NN)	Piper sarmentosum	M. tuberculosis H37Ra	25	Tuntiwachwuttikul et al., 2006a
		Metil 7-metoxianodendroato	Zanthoxylum wutaiense	M. tuberculosis H37Rv	35	Huang et al., 2008
		7-metoxiwutaifuranal			35	
		Wutaiensal			30	
TERPENOS	Sesquiterpenos	Suberosol B	Beilschmiedia erythrophloia	M. tuberculosis H37Rv	28.9	Yang et al., 2009
		Goyazansólido	Camchaya calcarea	M. tuberculosis H37Ra	3.1	Vongvanich et al., 2006
		Centraterino			3.1	
		Lichnoforolido B			6.2	
		Isogoyazansolido			1.5	
		Isocentraterino			3.1	
		5-epiisogoyazensolido			3.1	
		5-epiisocentraterino			3.1	
		Germacrano			50	
		Farnesol	Chamaedora tepejilote	M. tuberculosis H37Rv	8	INI, 1994
		Longifoleno	Juniperus communis	M. tuberculosis H37Rv	92.4	Gordien, Gray, Franzblau, & Seidel, 2009
		Farnesol	Leucas volkensii	M. tuberculosis	8	Rajab, Cantrell, Franzblau, & Fischer, 1998

		Sesquiterpenos dihidroagarofuranoides (NN)	<i>Microtropis fokienensis</i>	<i>M. tuberculosis</i> 90-221387	15.8-19.5 μ M	Chen, Chou, Peng, Chen, & Yang, 2007
		Mutagino			51.8 μ M	
		Orbiculino G			14.6 μ M	
		Tripogelino G-2			26 μ M	
		15-acetoxiorbiculin G	<i>Microtropis japonica</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	39.6	Chen, Yang, Peng, Chen, & Miaw, 2008
		Salasol			28.2	
		Celahino			30.6	
		α -humuleno	<i>Polyalthia cerasoides</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.25	Kanokmedhakul <i>et al.</i> , 2007)
	Monoterpenos	Globiferino	<i>Cordia globifera</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.2	Dettrakul <i>et al.</i> , 2009
		Geraniol	<i>Leucas volkensii</i>	<i>M. tuberculosis</i>	64	Rajab <i>et al.</i> , 1998
	Diterpenos	Ácido pimarico	<i>Ansiochilus harmandii</i>	<i>M. tuberculosis</i>	50	Lekphrom, Kanokmedhakul, & Kanokmedhakul, 2010
		Ácido 9 α ,13 α -epidioxiabiet-8(14)-en-18-oico				
		Ácido 15-hidroxidehidroabiético				
		Azorellanona	<i>Azorella compacta</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. tuberculosis</i> CIBIN/UMF 15:99	12.5-25	Molina-Salinas <i>et al.</i> , 2010; Molina-Salinas, Bórquez, Fernández, <i>et al.</i> , 2010
		Azorellanol				
		Mulinol				
		Escobarina A	<i>Calliandra californica</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. tuberculosis</i> CIBIN/UMF 15:99	25 y 12.5, respectivamente 50 (ambos)	Encarnación-Dimayuga <i>et al.</i> , 2006
		Escobarina B				
		Diterperno <i>seco</i> -abietano (NN)	<i>Callicarpa pilosissima</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	38 μ M	Chen, Wu, Peng, Chen, & Chu, 2009
		Ácido calicárpico			63.6 μ M	
		<i>ent</i> -3 β -hidroxitrachilobano	<i>Jungermannia exsertifolia</i> subsp. <i>Cordifolia</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	61	Scher <i>et al.</i> , 2010
		<i>ent</i> -trachiloban-2-oano			50	

		<i>ent</i> -3 β -acetoxi-19-hidroxitrachilobano			59	
		<i>ent</i> -trachiloban-17-al			24	
		Totarol	<i>Juniperus communis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	21.1	Gordien <i>et al.</i> , 2009
		(E)-fitol	<i>Leucas volkensii</i>	<i>M. tuberculosis</i>	2	Rajab <i>et al.</i> , 1998
		Fitanol			2	
		(Z)-fitol			2	
		(E)- y (Z)-fitol			2	
		Ácido carnósico	<i>Salvia africana-lutea</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	28 μ M	Hussein, Meyer, Jimeno, & Rodríguez, 2007
		Diterpeno labadano (NN)	<i>Orthosiphon labiatus</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	49.9	Hussein <i>et al.</i> , 2007
		Diterpenos tipo jatrofano (NN)	<i>Pendilanthus tithymaloides</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5-50	Mongkolvisut & Sutthivaiyakit, 2007
		7 α -acetoxi-6 β -hidroxileanona	<i>Plectranthus grandidentatus</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y MDR	25 y 3.12, respectivamente	Rijo <i>et al.</i> , 2010
		(E)-fitol	<i>Pourthiaea lucida</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12.5	Chen <i>et al.</i> , 2010
	Triterpenos	Ácido ursólico	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y H37Rv GFP	256 y 98, respectivamente	Jaki <i>et al.</i> , 2008
		Ácido ursólico + Ácido oleanólico	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y H37Rv GFP	65y 30, respectivamente	
		Azaradiona	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	6.25	Maneerat, Laphookhieo, Koysomboon, & Chantrapromma, 2008
		Escualeno	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	100	Noro <i>et al.</i> , 2008
		Epoxiazaradiona	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Maneerat <i>et al.</i> , 2008
		Tetrahidroxiescualeno	ND	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	10	Noro <i>et al.</i> , 2008
		Hidroperoxiciloartano	<i>Blepharadon nitidum</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	25	Aponte <i>et al.</i> , 2008
		Aegicerino	<i>Clavija procera</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3.1	Rojas <i>et al.</i> , 2006
		Ácido betulínico	<i>Diospyros decandra</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	25	Nareeboon <i>et al.</i> , 2006

		Triterpeno dimetiléster taraxerano (NN)	<i>Elasterospermum tapos</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	3.1	Pattamadilok & Suttisri, 2008
		Triterpeno <i>seco</i> -taraxano		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	25	
		24,24-dimetil-5 β -tirucall-9(11),25-dien-3-ono	<i>Pandanus tectorius</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	64	Noro <i>et al.</i> , 2008; Tan <i>et al.</i> , 2008
		Ácido boniánico A	<i>Radermachera boniana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	34.8 μ M	Truong <i>et al.</i> , 2011
		Ácido boniánico B			9.9 μ M	
		Tetrahidroxiescualeno	<i>Rhus taitensis</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	10	Antinori & Bock, 1956; Jimenez-Arellanes, Meckes, Ramirez, Torres, & Luna-Herrera, 2003; Noro <i>et al.</i> , 2008; Tan <i>et al.</i> , 2008
		Triterpenos de tipo éster, lupano, ceanotano	<i>Ziziphus cambodiana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	12.5-50	Rojas <i>et al.</i> , 2006
ESTEROIDES		β -sitosterol	<i>Morinda citrifolia</i>	<i>M. tuberculosis</i>	128	Saludes, Garson, Franzblau, & Aguinaldo, 2002
		Cicloartenol			32	
		Estigmasterol			32	
		Epidiosisterol			2.5	
		Peróxido de ergosterol	<i>Radermachera boniana</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3.5 μ M	Truong <i>et al.</i> , 2011
		β -sitostenona			39.5 μ M	

NN= No nombre

ND= No determinado

1.4 Conclusiones

Existe una amplia y basta información científica dónde se avala el uso de los productos naturales como fuente potencial de nuevos esquemas terapéuticos en materia de la TB. Las investigaciones científicas a nivel mundial se centran en dos aspectos principales: el uso de extractos naturales y compuestos aislados a partir de plantas con potencial actividad antituberculosa. Especies vegetales de todo el mundo aportan un número importante y novedoso de extractos antituberculosos. Estas especies representan la principal fuente de moléculas que, en un futuro, podrían ayudar al control y tratamiento de la TB en cualquiera de sus formas (susceptible y MDR). Por su parte, los metabolitos secundarios aislados de plantas presentan una amplia variedad de estructuras químicas, dentro de las que destacan, alcaloides, compuestos fenólicos, terpenos y esteroides, entre otros. La recopilación bibliográfica presentada, muestra de manera importante, la gran fuente de agentes antituberculosos que representan las especies vegetales hoy en día.

En este contexto, tanto los extractos naturales como los compuestos aislados que se obtienen a partir de éstos abren una importante área de oportunidad para ser aplicados dentro de esquemas terapéuticos formales o como coadyuvantes de los fármacos existentes para incrementar la eficiencia de los tratamientos de TB. Sin embargo, para su aplicación en humanos, éstos activos necesitan estar formulados, lo cual presenta ciertas limitantes y dificultades que se abordarán durante los próximos capítulos. Además, es importante establecer bioensayos confiables para evaluar la toxicología y posibles efectos adversos que los extractos y compuestos aislados puedan presentar en organismos mayores.

REFERENCIAS

- Agrawal DK, Saikia D, Tiwari R, Ojha S, Shanker K, Kumar JK, Khanuja SP. 2008. Demethoxycurcumin and its semisynthetic analogues as antitubercular agents. *Planta Medica*, 74(15), 1828–1831.
- Aguinaldo AM, Dalangin-Mallari VM, Macabeo APG, Byrne LT, Abe F, Yamauchi T, Franzblau SG. 2007. Quinoline alkaloids from *Lunasia amara* inhibit *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(6).
- American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention, & Diseases Society of America. 2003. Treatment of Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167, 603–662.
- Antinori F, Bock C. 1956. Activity of squalene on *Mycobacterium tuberculosis in vitro* and *in vivo*. *Rivista Italiana D'igiene*, 16(3–4), 183–187.
- Antony M, James J, Shekhar Misra C, Mundur Sagadevan LD, Veettil AT, Thankamani V. 2012. Anti mycobacterial activity of the plant extracts of *Alstonia scholaris*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4(1), 40–42.
- Aponte JC, Vaisberg AJ, Rojas R, Caviedes L, Lewis WH, Lamas G, Hammond GB. 2008. Isolation of cytotoxic metabolites from targeted peruvian amazonian medicinal plants. *Journal of Natural Products*, 71(1), 102–105.
- Arunrattiyakorn P, Suksamrarn S, Suwannasai N, Kanzaki H. 2011. Microbial metabolism of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. *Phytochemistry*, 72(8), 730–734.
- Asres K, Bucar F, Edelsbrunner S, Kartnig T, Höger G, Thiel W. 2001. Investigations on antimycobacterial activity of some Ethiopian medicinal plants. *Phytotherapy Research: PTR*, 15(4), 323–326.
- Bapela NB, Lall N, Fourie PB, Franzblau SG, Van Rensburg CEJ. 2006. Activity of 7-methyljuglone in combination with antituberculous drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytomedicine*, 13(9), 630–635.
- Bhatia Sujata K. 2010. Chapter 8: Tuberculosis. In *Biomaterials for Clinical Applications* (First Edition, pp. 167–181). Springer Science Business Media.

- Boonphong S, Baramée A, Kittakoop P, Puangsombat P. 2007. Antitubercular and antiparasmodial prenylated flavones from the roots of *Artocarpus altilis*. Chiang Mai Journal of Science, 34(3), 339–344.
- Boonphong Surat, Puangsombat P, Baramée A, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. 2007. Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. Journal of Natural Products, 70(5), 795–801.
- Camacho MR, Kirby GC, Warhurst DC, Croft SL, Phillipson JD. 2000. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. Planta Medica, 66(5), 478–480.
- Camacho-Corona M del R, Favela-Hernández JM de J, González-Santiago O, Garza-González E, Molina-Salinas GM, Said-Fernández S, Luna-Herrera J. 2009. Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of the Mexican Chemical Society, 53(2), 71–75.
- Camacho-Corona M del R, Ramírez-Cabrera MA, Santiago OG, Garza-González E, Palacios I de P, Luna-Herrera J. 2008. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. Phytotherapy Research, 22(1), 82–85.
- Cantrell CL, Fischer NH, Urbatsch L, McGuire MS, Franzblau SG. 1998. Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central, and North America. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 5(2), 137–145.
- Cateni F, Zilic J, Zacchigna M. 2008. Isolation and structure elucidation of cerebrosides from *Euphoria platyphyllos* L. Scientia Pharmaceutica, 76, 451–469.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). Cifras Oficiales de Tuberculosis en México. Consulta: 13 de junio 2017, Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html

- Chang MW, Tasaka H, Kuwabara M, Watanabe T, Matsuo Y. 1979. Effects of panax ginseng extracts on the growth of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 28(2), 115–118.
- Channabasappa HS, Shrinivas JD, Venkatrao KH. 2015. Evaluation of antibacterial and antitubercular activity of *Cassia fistula* Linn root. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 6, 82–84.
- Chen JJ, Chou ET, Peng CF, Chen IS, Yang SZ, Huang HY. 2007. Novel epoxyfuranoid lignans and antitubercular constituents from the leaves of *Beilschmiedia tsangii*. *Planta Medica*, 73(6), 567–571.
- Chen JJ, Chou TH, Peng CF, Chen IS, Yang SZ. 2007. Antitubercular dihydroagarofuranoid sesquiterpenes from the roots of *Microtropis fokienensis*. *Journal of Natural Products*, 70(2), 202–205.
- Chen JJ, Lin WJ, Shieh PC, Chen IS, Peng CF, Sung PJ. 2010. A new long-chain alkene and antituberculosis constituents from the leaves of *Pourthiaea lucida*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(3), 717–721.
- Chen JJ, Peng CF, Huang HY, Chen IS. 2006. Benzopyrans, biphenyls and xanthenes from the root of *Garcinia linii* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Medica*, 72(5), 473–477.
- Chen JJ, Wu HM, Peng CF, Chen IS, Chu SD. 2009. seco-Abietane diterpenoids, a phenylethanoid derivative, and antitubercular constituents from *Callicarpa pilosissima*. *Journal of Natural Products*, 72(2), 223–228.
- Chen JJ, Yang CS, Peng CF, Chen IS, Miaw CL. 2008. Dihydroagarofuranoid Sesquiterpenes, a Lignan Derivative, a Benzenoid, and Antitubercular Constituents from the Stem of *Microtropis japonica*. *Journal of Natural Products*, 71(6), 1016–1021.
- Chiang CC, Cheng MJ, Peng CF, Huang HY, Chen IS. 2010. A novel dimeric coumarin analog and antimycobacterial constituents from *Fatoua pilosa*. *Chemistry & Biodiversity*, 7(7), 1728–1736.
- Chien Y, Peng C, Lin C, Chen I, Tsai I. 2010. Secondary metabolites from the root of *Ehretia longiflora* and their antitubercular activity. *Planta Medica*, 76(12), P436.

- Chokchaisiri R, Suaism C, Sriphota S, Chindaduang A, Chuprajob T, Suksamrarn A. 2009. Bioactive flavonoids of the flowers of *Butea monosperma*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 57(4), 428–432.
- Deng S, Wang Y, Inui T, Chen SN, Farnsworth NR, Cho S, Pauli GF. 2008. Anti-TB polyynes from the roots of *Angelica sinensis*. Phytotherapy Research: PTR, 22(7), 878–882.
- Dettrakul S, Surerum S, Rajviroongit S, Kittakoop P. 2009. Biomimetic transformation and biological activities of Globiferin, a terpenoid benzoquinone from *Cordia globifera*. Journal of Natural Products, 72(5), 861–865.
- Dey D, Ray R, Hazra B. 2015. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. Pharmaceutical Biology, 53(10), 1474–1480.
- Encarnación-Dimayuga R, Agúndez-Espinoza J, García A, Delgado G, Molina-Salinas GM, Said-Fernández S. 2006. Two new cassane-type diterpenes from *Calliandra californica* with antituberculosis and cytotoxic activities. Planta Medica, 72, 757–761.
- Gomez-Cansino R, Espitia-Pinon CI, Campos-Lara MG, Guzman-Gutierrez SL, Segura-Salinas E, Echeverria-Valencia G, Reyes-Chilpa R. 2015. Antimycobacterial and HIV-1 reverse transcriptase activity of Julianaceae and Clusiaceae plant species from Mexico. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, e183036.
- Gomez-Flores R, Arzate-Quintana C, Quintanilla-Licea R, Tamez-Guerra P, Monreal-Cuevas E, Rodríguez-Padilla C. 2008. Antimicroabial activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) leaf extracts and active fractions against *Mycobacterium tuberculosis*. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 3(2), 188–194.
- Gordien AY, Gray AI, Franzblau SG, Seidel V. 2009. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cuppressaceae). Journal of Ethnopharmacology, 126(3), 500–505.

- Gowrish A, Vagdevi HM, Rajashekar H. 2015. *In vitro* antioxidant and antitubercular activity of *Leucas marrubioides* Desf. root extracts. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 5(2), 137–142.
- Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, Kumar JK, Khanuja SPS. 2008. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. Journal of Ethnopharmacology, 116(2), 377–380.
- Hong Q, Minter DE, Franzblau SG, Reinecke MG. 2008. Anti-tuberculosis compounds from two Bolivian medicinal plants, *Senecio mathewsii* and *Usnea florida*. Natural Product Communications, 3(9), 1337–1384.
- Horsburgh CRJ, Barry CEI, Lange C. 2015. Treatment of Tuberculosis. New England Journal of Medicine, 373(22), 2149–2160.
- Huang HY, Ishikawa T, Peng, CF, Tsai IL, Chen IS. 2008. Constituents of the root wood of *Zanthoxylum wutaiense* with antitubercular activity. Journal of Natural Products, 71(7), 1146–1151.
- Hussein AA, Meyer JJM, Jimeno ML, Rodríguez B. 2007. Bioactive diterpenes from *Orthosiphon labiatus* and *Salvia africana-lutea*. Journal of Natural Products, 70(2), 293–295.
- INI. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional mexicana. Consultado Junio 19, 2017, from <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>
- Jain RC. 1998. Anti tubercular activity of garlic oil. Indian Journal of Pathology & Microbiology, 41(1), 131.
- Jaki BU, Franzblau SG, Chadwick LR, Lankin DC, Zhang F, Wang Y, Pauli GF. 2008. Purity–activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid. Journal of Natural Products, 71(10), 1742–1748.
- Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Ramirez R, Torres J, Luna-Herrera J. 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. Phytotherapy Research, 17(8), 903–908.
- Joycharat N, Greger H, Hofer O, Saifah E. 2007. Flavaglines and triterpenoids from the leaves of *Aglaia forbesii*. Phytochemistry, 69, 206–211.
- Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Lekphrom R. 2007. Bioactive constituents of the roots of *Polyalthia cerasoides*. Journal of Natural Products, 70(9), 1536–1538.

- Kaur R, Kaur H. 2015. Antitubercular activity and phytochemical screening of selected medicinal plants. *Oriental Journal of Chemistry*, 31, 597–600.
- Koch M, Bugni TS, Pond CD, Sondossi M, Dindi M, Piskaut P, Barrows LR. 2009. Antimycobacterial activity of *Exocarpos latifolius* is due to exocarpic acid. *Planta Medica*, 75(12), 1326–1330.
- Koysomboon S, van Altena I, Kato S, Chantrapromma K. 2006. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry*, 67(10), 1034–1040.
- Lahlou M. 2013. The success of natural products in drug discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 17–31.
- Lakshmanan D, Werngren J, Jose L, Suja KP, Nair MS, Varma RL, Kumar RA. 2011. Ethyl p-methoxycinnamate isolated from a traditional anti-tuberculosis medicinal herb inhibits drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *Fitoterapia*, 82(5), 757–761.
- Lall N, Hussein AA, Meyer JJM. 2006. Antiviral and antituberculous activity of *Helichrysum melanacme* constituents. *Fitoterapia*, 77(3), 230–232.
- Laurenzi M, Ginsberg A, Spigelman M. 2007. Challenges Associated with current and future TB treatment. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 7, 105–119.
- Lekphrom R, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K. 2009. Bioactive styryllactones and alkaloid from flowers of *Goniothalamus laoticus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 47–50.
- Lekphrom R, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K. 2010. Bioactive diterpenes from the aerial parts of *Anisochilus harmandii*. *Planta Medica*, 76(7), 726–728.
- León-Díaz R, Meckes M, Said-Fernández S, Molina-Salinas GM, Vargas-Villarreal J, Torres J, Jiménez-Arellanes A. 2010. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(1), 45–51.
- León-Rivera I, Mirón-López G, Molina-Salinas GM, Herrera-Ruiz M, Estrada-Soto S, del Carmen Gutiérrez M, Said-Fernández S. 2008. Tyrianthnic acids from *Ipomoea tyrianthina* and their antimycobacterial activity, cytotoxicity, and effects on the central nervous system. *Journal of Natural Products*, 71(10), 1686–1691.
- Liang HX, Dai HQ, Fu HA, Dong XP, Adebayo AH, Zhang LX, Cheng YX. 2010. Bioactive compounds from *Rumex* plants. *Phytochemistry Letters*, 3(4), 181–184.

- Lin WY, Peng CF, Tsai IL, Chen JJ, Cheng MJ, Chen IS. 2005. Antitubercular constituents from the roots of *Engelhardia roxburghiana*. *Planta Medica*, 71(2), 171–175.
- Ma C, Case RJ, Wang Y, Zhang HJ, Tan GT, Van Hung N, Pauli GF. 2005. Antituberculosis constituents from the stem bark of *Micromelum hirsutum*. *Planta Medica*, 71(3), 261–267.
- Maggi N, Pasqualucci CR, Ballotta R, Sensi P. 1966. Rifampicin: a new orally active rifamycin. *Chemotherapy*, 11(5), 285–292.
- Maneerat W, Laphookhieo S, Koysomboon S, Chantrapromma K. 2008. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*. *Phytomedicine*, 15(12), 1130–1134.
- McCutcheon AR, Stokes RW, Thorson LM, Ellis SM, Hancock REW, Towers GHN. 1997. Anti-mycobacterial screening of british columbian medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy*, 35(2), 77–83.
- Melo MF, Santos CA, Chiappeta AA, de Mello JF, Mukherjee R. 1987. Chemistry and pharmacology of a tertiary alkaloid from *Strychnos trinervis* root bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 19(3), 319–325.
- Molina-Salinas GM, Pérez-López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernández S, de Torres NW. 2007. Evaluation of the flora of northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 435–441.
- Molina-Salinas GM, Bórquez J, Ardiles A, Said-Fernández S, Loyola LA, San-Martín A, Peña-Rodríguez LM. 2010. Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*, 81(1), 50–54.
- Molina-Salinas GM, Bórquez J, Said-Fernández S, Loyola LA, Yam-Puc A, Becerril-Montes P, Peña-Rodríguez LM. 2010. Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*, 81(3), 219–222.
- Mongkolvisut W, Sutthivaiyakit S. 2007. Antimalarial and antituberculous poly-o-acylated jatrophone diterpenoids from *Pedilanthus tithymaloides*. *Journal of Natural Products*, 70(9), 1434–1438.

- Munna S, Basha SC, Reddy PR, Pramod N, Kumar YP, Basha GM. 2014. Antitubercular activity of *Actiniopteris radiata* Linn. Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences, 5(1), 1443–1445.
- Namdaung U, Aroonrerk N, Suksamrarn S, Danwisetkanjana K, Saenboonrueng J, Arjchomphu W, Suksamrarn A. 2006. Bioactive constituents of the root bark of *Artocarpus rigidus* subsp. *rigidus*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 54(10), 1433–1436.
- Nareeboon P, Kraus W, Beifuss U, Conrad J, Klaiber I, Sutthivaiyakit S. 2006. Novel 24-nor-, 24-nor-2,3-seco-, and 3,24-dinor-2,4-seco-ursane triterpenes from *Diospyros decandra*: evidences for ring A biosynthetic transformations. Tetrahedron, 62(23), 5519–5526.
- Navarro-García VM, Luna-Herrera J, Rojas-Bribiesca MG, Álvarez-Fitz P, Ríos MY. 2011. Antibacterial activity of *Aristolochia brevipes* against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Molecules, 16(9), 7357–7364.
- Negi AS, Kumar JK, Luqman S, Saikia D, Khanuja SPS. 2010. Antitubercular potential of plants: a brief account of some important molecules. Medicinal Research Reviews, 30(4), 603–645.
- Nogueira T, Medeiros MA, Marcelo-Curto MJ, García-Pérez BE, Luna-Herrera J, Costa MC. 2013. Profile of antimicrobial potential of fifteen *Hypericum* species from Portugal. Industrial Crops and Products, 47, 126–131.
- Noro JC, Barrows LR, Gideon OG, Ireland CM, Koch M, Matainaho T, Bugni TS. 2008. Tetrahydroxysqualene from *Rhus taitensis* shows antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Natural Products, 71(9), 1623–1624.
- O'Donnell G, Poeschl R, Zimhony O, Gunaratnam M, Moreira JBC, Neidle S, Gibbons S. 2009. Bioactive pyridine-N-oxide disulfides from *Allium stipitatum*. Journal of Natural Products, 72(3), 360–365.
- Pan PC, Cheng MJ, Peng CF, Huang HY, Chen JJ, Chen IS. 2010. Secondary metabolites from the roots of *Litsea hypophaea* and their antitubercular activity. Journal of Natural Products, 73(5), 890–896.
- Panthama N, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K. 2010. Polyacetylenes from the roots of *Polyalthia debilis*. Journal of Natural Products, 73(8), 1366–1369.

- Pattamadilok D, Suttisri R. 2008. Seco-terpenoids and other constituents from *Elateriospermum tapos*. *Journal of Natural Products*, 71(2), 292–294.
- Prabu A, Hassan S, Prabuseenivasan N, Shainaba AS, Hanna LE, Kumar V. 2015. Andrographolide: a potent antituberculosis compound that targets aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 61, 133–140.
- Rajab MS, Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. 1998. Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta Medica*, 64(1), 2–4.
- Rangkaew N, Suttisri R, Moriyasu M, Kawanishi K. 2009. A new acyclic diterpene acid and bioactive compounds from *Knema glauca*. *Archives of Pharmacal Research*, 32(5), 685–692.
- Rijo P, Simões MF, Francisco AP, Rojas R, Gilman RH, Vaisberg AJ, Moiteiro C. 2010. Antimycobacterial metabolites from *Plectranthus: royleanone* derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Chemistry & Biodiversity*, 7(4), 922–932.
- Rivero-Cruz I, Acevedo L, Guerrero JA, Martínez S, Bye R, Pereda-Miranda R, Mata R. 2005. Antimycobacterial agents from selected mexican medicinal plants. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(9), 1117–1126.
- Rojas R, Caviedes L, Aponte JC, Vaisberg AJ, Lewis WH, Lamas G, Hammond GB. 2006. Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from *Clavija procera*. *Journal of Natural Products*, 69(5), 845–846.
- Rukachaisirikul T, Saekee A, Tharibun C, Watkuolham S, Suksamrarn A. 2007. Biological activities of the chemical constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina subumbrans*. *Archives of Pharmacal Research*, 30(11), 1398–1403.
- Saludes JP, Garson MJ, Franzblau SG, Aguinaldo AdM. 2002. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phytotherapy Research: PTR*, 16(7), 683–685.
- Sheeba DG, Gomathi KS, Citarasu D. 2015. Anti-mycobacterial and phytochemical investigation of methanol extracts of few medicinal plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 8(3), 480–486.

- Singh R, Hussain S, Verma R, Sharma P. 2013. Anti-mycobacterial screening of five Indian medicinal plants and partial purification of active extracts of *Cassia sophera* and *Urtica dioica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(5), 366–371.
- Solis PN, Lang'at C, Gupta MP, Kirby GC, Warhurst DC, Phillipson JD. 1995. Bioactive compounds from *Psychotria camponutans*. *Planta Medica*, 61(1), 62–65.
- Songsiang U, Wanich S, Pitchuanchom S, Netsopa S, Uanporn K, Yenjai C. 2009. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. *Fitoterapia*, 80(7), 427–431.
- Sunthitikawinsakul A, Kongkathip N, Kongkathip B, Phonnakhu S, Daly JW, Spande TF, Rochanaruangrai S. 2003. Coumarins and carbazoles from *Clausena excavata* exhibited antimycobacterial and antifungal activities. *Planta Medica*, 69(2), 155–157.
- Sutthivaiyakit S, Thongnak O, Lhinhatrakool T, Yodchun O, Srimark R, Dowtaisong P, Chuankamnerdkarn M. 2009. Cytotoxic and antimycobacterial prenylated flavonoids from the roots of *Eriosema chinense*. *Journal of Natural Products*, 72(6), 1092–1096.
- Tan MA, Takayama H, Aimi N, Kitajima M, Franzblau SG, Nonato MG. 2008. Antitubercular triterpenes and phytosterols from *Pandanus tectorius* Soland. var. *laevis*. *Journal of Natural Medicines*, 62(2), 232–235.
- Thongthoom T, Songsiang U, Phaosiri C, Yenjai C. 2010. Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. *Archives of Pharmacal Research*, 33(5), 675–680.
- Truong NB, Pham CV, Doan HTM, Nguyen HV, Nguyen CM, Nguyen HT, Chau MV. 2011. Antituberculosis cycloartane triterpenoids from *Radermachera boniana*. *Journal of Natural Products*, 74(5), 1318–1322.
- Tuntiwachwuttikul P, Phansa P, Pootaeng-On Y, Taylor WC. 2006a. Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(2), 149–151.

- Tuntiwachwuttikul P, Phansa P, Pootaeng-On Y, Taylor WC. 2006b. Chromones from the branches of *Harrisonia perforata*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 54(1), 44–47.
- Valcic S, Montenegro G, Mujica AM, Avila G, Franzblau S, Singh MP, Timmermann BN. 1999. Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from Central Chile. Journal of Biosciences, 54(5–6), 406–416.
- Vongvanich N, Kittakoop P, Charoenchai P, Intamas S, Sriklung K, Thebtaranonth Y. 2006. Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. Planta Medica, 72(15), 1427–1430.
- Wang JF, Dai HQ, Wei YL, Zhu HJ, Yan YM, Wang YH, Cheng YX. 2010. Antituberculosis agents and an inhibitor of the para-aminobenzoic acid biosynthetic pathway from *Hydnocarpus anthelminthica* seeds. Chemistry & Biodiversity, 7(8), 2046–2053.
- Wirasathien L, Boonarkart C, Pengsuparp T, Suttisri R. 2006. Biological Activities of Alkaloids from *Pseuduvaria setosa*. Pharmaceutical Biology, 44(4), 274–278.
- World Health Organization. (2016). *Global Tuberculosis Report 2016*. World Health Organization. Consultado en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>
- World Health Organization. (2017a). Informe mundial sobre la tuberculosis. Consultado 15 Mayo, 2017, en http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/
- World Health Organization. (2017b). What is multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and how do we control it? Consultado Junio 14, 2017, en <http://www.who.int/features/qa/79/en/>
- World Health Organization. (2017c). Estrategia de la OMS para poner fin a la tuberculosis de aquí a 2035. Consultado Mayo 15, 2017, from <http://www.who.int/tb/strategy/es/>
- Wu CC, Peng CF, Tsai IL, Abd El-Razek MH, Huang HS, Chen IS. 2007. Secondary metabolites from the roots of *Engelhardia roxburghiana* and their antitubercular activities. Phytochemistry, 68(9), 1338–1343.

Yang PS, Cheng MJ, Peng CF, Chen JJ, Chen IS. 2009. Endiandric acid analogues from the roots of *Beilschmiedia erythrophloia*. *Journal of Natural Products*, 72(1), 53–58.

CAPÍTULO II:

NANOTECNOLOGÍA APLICADA A SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRODUCTOS NATURALES

NANOTECNOLOGÍA APLICADA A SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRODUCTOS NATURALES

II.1 Introducción

El uso de los sistemas de liberación particulados en el área farmacéutica y, más específicamente, en la administración de principios activos se ha incrementado notablemente durante los últimos años. Principalmente, se ha utilizado para reducir la toxicidad y los efectos secundarios de los fármacos, así como para otorgarles protección. Además, el uso de dichos sistemas permite el biodireccionamiento a células, órganos o tejidos blanco afectados por diversos padecimientos. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, estos sistemas permiten la formulación de compuestos biológicamente activos de diversa naturaleza, dentro de los que destacan los productos naturales, tales como los extractos de diferentes polaridades, los aceites esenciales y los compuestos activos aislados.

La encapsulación de principios activos, además de reducir la reactividad de los compuestos con el ambiente (i.e. agua, luz, oxígeno) y disminuir su evaporación o su transferencia hacia el medio ambiente, también permite enmascarar sabores y promover la distribución uniforme de los activos en los productos finales cuando se utilizan en poca cantidad.

Particularmente, sistemas como las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas sólidas lipídicas y las ciclodextrinas, entre otros, han sido aprovechados para la formulación de productos naturales. Diversas formulaciones han demostrado su potencial aplicación para mantener y, en ocasiones, aumentar la actividad biológica probada de productos naturales. Formulaciones con actividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena, conservadora de alimentos y cosmética han sido desarrolladas y probadas con éxito tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

A lo largo del presente capítulo se abordará de manera puntual cada uno de los sistemas particulados que se han utilizado para la incorporación y formulación de productos naturales, destacando sus propiedades, así como sus ventajas y desventajas.

II.2 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (NP) son partículas sólidas coloidales con un rango de tamaño que va de 1 a 600 nm. Estos coloides están constituidos por materiales macromoleculares sintéticos o naturales y pueden formar nanocápsulas o nanoesferas, en las cuales el principio activo (fármaco o productos naturales) se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o adherido (Figura II.1).

Las características fisicoquímicas de las NP hacen de estas uno de los sistemas más novedosos para la liberación de diversos compuestos activos, entre ellos los productos naturales. Entre las ventajas asociadas a sus características fisicoquímicas tenemos que:

- Debido a su tamaño nanométrico, comparable con los componentes en células humanas, las NP pueden ser utilizadas para facilitar la interacción con diversos sistemas biológicos (i.e. células cancerígenas, virus, bacterias, células sanguíneas y parásitos).
- Considerando su amplia área superficial, el número de moléculas de activo biológico presentes en la superficie de las NP se incrementa conforme disminuye el tamaño del sistema.
- Tomando en cuenta su tamaño submicrónico, es fácil mantener a las nanopartículas en suspensión líquida, ya que el efecto de la fuerza gravitacional sobre las nanopartículas es muy pequeño. Esto permite tener sistemas mucho más estables, impidiendo su precipitación en la formulación en la que se encuentra.
- Por su pared polimérica, las nanopartículas otorgan protección a los principios activos tanto de factores ambientales (i.e. luz, humedad, temperatura) como del entorno biológico en donde se aplican (i.e. enzimas, pH).
- La morfología superficial puede jugar un rol importante en la adhesión del sistema acarreador con el sistema biológico blanco (i.e. célula, tejido), debido a que se incrementan las atracciones de Van der Waals entre ellas. Más allá de esto, la superficie de las nanopartículas puede ser modificada para aumentar o disminuir, según se desee, su interacción con el sistema biológico blanco y, así, eficientizar la actividad del principio activo.

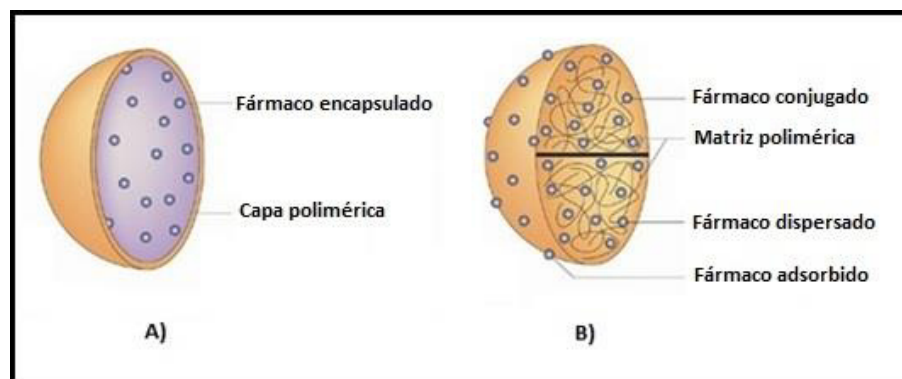


Figura II.1. Estructura de los dos tipos de nanopartículas poliméricas:
A) Nanocápsula y B) Nanoesfera.

Existen diversos trabajos en los que se han desarrollado formulaciones de NP cargadas de productos naturales, incluyendo aceites esenciales, extractos crudos de plantas y compuestos aislados. Por ejemplo, con la finalidad de incrementar la actividad antimicrobiana que presenta el aceite esencial de canela contra *Phytophthora drechsleri* (fitopatógeno del pepino), Mohammadi y col. desarrollaron nanopartículas de quitosán cargadas con este aceite. La formulación presentó un tamaño de partícula en un rango de 100 a 190 nm, con porcentajes de encapsulación y de eficiencia de encapsulación de 2-17% y 3-4%, respectivamente. En los estudios de actividad antimicrobiana contra *P. drechsleri*, las NP cargadas con el aceite a una concentración de 1.5 g/L disminuyeron significativamente la incidencia del microorganismo por un período de siete días en pepinos inoculados con el patógeno. Además, el aceite encapsulado extendió la vida de anaquel del pepino hasta por 21 días (Mohammadi, Hashemi & Hosseini, 2015). Otras formulaciones similares con actividad antiparasitaria y antimicrobiana se han desarrollado para su aplicación en la industria de alimentos. Aceites esenciales de eucalipto, *Eucalyptus staigeriana* y *E. citriodora*, han sido encapsulados en NP a base de goma de anacardo y evaluados en su actividad antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*. En comparación con el aceite libre de *E. staigeriana*, las nanopartículas mostraron una mayor actividad antimicrobiana debido al efecto en conjunto entre el aceite y la goma de anacardo. Por su parte, la formulación del aceite de *E. citriodora* en NP de quitosán, con una concentración de 8 mg/mL de aceite, mostró inhibir la eclosión de las larvas del nematodo *Haemonchus contortus* en un 93%. En ambos estudios, los resultados

demostraron que las formulaciones pueden ser utilizadas como aditivos en alimentos para el control de *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* y *H. contortus* (Herculano *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2014).

Las NP también representan una excelente opción para la encapsulación y liberación de compuestos aislados a partir de fuentes naturales. Terpenos aislados de *Ginkgo biloba* han sido encapsulados en NP de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y de polietilenglicol (PEG) para el desarrollo de una formulación intravenosa. Los terpenos mostraron una eficiencia de encapsulación de 79% y se observó una liberación sostenida y sincronizada de los mismos, debido principalmente al largo tiempo de circulación de las nanopartículas (inducido por el PEG) y por la lenta degradación del PLGA. Dichos resultados mostraron que las NP pueden funcionar como sistemas para la liberación sostenida y sincronizada de múltiples compuestos naturales (Han *et al.*, 2012). Otros ejemplos de formulaciones incluyen nanopartículas elaboradas a base de PLGA y compuestos aislados como triterpenoides, grandisina, coumarina y apigenina. Los ensayos *in vitro* mostraron que la nanoencapsulación de los compuestos incrementa la actividad citotóxica de los mismos, lo que sustenta su aplicación como posible terapia anticancerígena (Bhattacharyya *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2013; Stecanella *et al.*, 2013). En otro estudio, Guerrero Barbosa y col. encapsularon la coenzima Q10, una quinona que posee capacidad antioxidante y ha demostrado inhibir la peroxidación de ácidos grasos, con un polímero de tipo metilacrilato. Aunque no se realizaron ensayos *in vitro*, las formulaciones mostraron eficiencias de encapsulación entre 50 y 90%. Los autores propusieron que debido a sus características (i.e tamaño, encapsulación) estas formulaciones pueden ser utilizadas como una forma de dosificación oral del compuesto activo (Guerrero Barbosa *et al.*, 2014).

Particularmente, en años recientes, la aplicación de las NP en el área dermatológica ha adquirido una gran relevancia debido a que pueden liberar activos para que tengan un efecto local o sistémico. En este contexto, Álvarez Román y col., estandarizaron la obtención de formulaciones con carvacrol (antioxidante) en nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona). Posteriormente caracterizaron a las formulaciones dermocinéticamente en base a estudios *in vitro* de permeación transdérmica. El porcentaje de encapsulación y

eficiencia de encapsulación fueron de 51 y 91%, respectivamente. Los estudios dermocinéticos mostraron que las nanopartículas penetran las capas más profundas del estrato córneo sin atravesar completamente la piel, lo que impide su llegada al torrente sanguíneo disminuyendo de manera importante los posibles efectos tóxicos y alergénicos de los compuestos encapsulados. La formulación óptima podría utilizarse como tratamiento preventivo contra el cáncer debido a su actividad antioxidante (Cavazos Rodríguez, 2011; Álvarez Román *et al.*, 2011).

En otro estudio, con el objetivo de investigar la solubilidad del extracto de *Garcinia mangostana* en dos diferentes vehículos (agua y crema), usualmente utilizados en cosmetología, se estudió la penetración de las NP y el extracto libre en piel de cerdo. El estudio mostró que, tanto las NP cargadas, como el extracto libre incorporados en la crema penetraron más profundo que si eran aplicados en una base acuosa. En conclusión, estas formulaciones favorecen la aplicación del extracto de *G. mangostana* en productos cosmetológicos (Tachaprutinun *et al.*, 2014).

Si bien los extractos crudos obtenidos a partir de plantas representan una fuente importante de tratamientos potenciales para distintas enfermedades, está claro que su complejidad y composición diversa, dificulta su aplicación directa en organismos. Aspectos de solubilidad de sus componentes y factores como la sinergia entre los componentes activos han incitado a la búsqueda de sistemas de liberación que permitan el uso de dichas fuentes naturales. Durante la última década, las NP han sido utilizadas para la aplicación de extractos con actividad anticancerígena. Por ejemplo, el extracto de raíz de *Polygala senega* y el extracto de *G. mangostana* han sido encapsulados en NP, obteniendo resultados prometedores en modelos *in vitro*. La formulación elaborada con PLGA y el extracto de *P. senega* mostró un tamaño de partícula alrededor de 147 nm, el cual potenció la incorporación celular de los componentes del extracto y mejoró su biodisponibilidad en la línea celular A549 de cáncer de pulmón (Paul *et al.*, 2011). Por su parte, la nanoencapsulación del extracto de *G. mangostana* con etilcelulosa mostró una mayor acumulación e internalización celular en comparación con el extracto libre. Además, cuando se llevaron a cabo estudios *in vitro*, las NP mostraron una actividad anticancerígena efectiva en células HeLa (Pan-In *et al.*, 2014a).

Por otro lado, tomando en cuenta sus propiedades antiulcerogénicas, los extractos de *G. mangostana* y *Passiflora serratodigitata* han sido incorporados en sistemas nanoparticulados. En estudios *in vitro* se probó su actividad contra *Helicobacter pylori*, mostrando además una buena capacidad para combatir la proliferación de la bacteria gástrica y evitar el desarrollo de úlceras y cáncer de estómago (Marc Strasser, 2014; Pan-In *et al.*, 2014b).

Por su parte, extractos de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) han sido nanoencapsulados para el enriquecimiento de sopas instantáneas y así incrementar las propiedades antioxidantes de dicho alimento (Deladino, Navarro & Martino, 2013). Más allá de los ensayos biológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, debido al gran potencial que representan las NP como sistemas acarreadores de extractos crudos, las últimas tendencias en investigación que se han realizado con las NP incluyen estudios de formulación con diseños factoriales que tienen como objetivo definir las condiciones óptimas para la elaboración de NP a gran escala (Ribeiro *et al.*, 2015).

En cuanto al estudio de extractos con otras actividades, como por ejemplo pesticidas, Figueroa y col., elaboraron NP a base de Eudragit L100-55 y extractos de *Annona muricata* (guanábana) y probaron su actividad en poblaciones de larvas de *Aedes aegypti*, vector transmisor del dengue. Los resultados de los ensayos *in vivo* mostraron que las NP cargadas presentaron hasta un 70% de mortalidad sobre las larvas del vector a una concentración de 60 ppm y una estabilidad de hasta 12 meses. Dicha formulación mostró un gran potencial para ser aplicada como bioinsecticida (Figueroa Espinoza, 2014).

II.3 Nanopartículas Sólidas Lípidicas

Las nanopartículas sólidas lípidicas (SLN) están compuestas de lípidos sólidos y emulsificantes dispersos en un medio acuoso (Figura II.2). Pueden ser producidas por homogenización a alta presión y se caracterizan por tener un tamaño de partícula menor a los 500 nm. Estos sistemas también pueden obtenerse por técnicas con solventes orgánicos homogenizados a alta presión/evaporación de solvente o dilución de microemulsiones. Las SLN combinan las ventajas de los acarreadores coloidales, dejando de lado las

desventajas de otros sistemas como los liposomas y las NP. Entre de las ventajas del uso de las SLN como acarreadores de principios activos encontramos:

- Posibilidad de controlar la liberación del principio activo y su biodireccionamiento.
- Incremento de la solubilidad de activos.
- Gran capacidad de carga del activo.
- Facilidad de incorporar activos lipofílicos o hidrofílicos.
- No presentan biotoxicidad.
- No se necesitan, en muchos casos, de solventes orgánicos para su preparación.
- Pocos problemas al momento de producirlas a gran escala o someterlas a esterilización.

Las SLN han sido utilizadas para la incorporación de compuestos lipofílicos aislados de plantas con el objetivo de tratar enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Por ejemplo, se estudió la coencapsulación de resveratrol y curcumina en SLN. La formulación mostró un incremento en la fotoestabilidad de los compuestos. Además, las SLN mostraron un perfil de liberación controlada de ambos polifenoles (Coradini *et al.*, 2014). En otro estudio, con el objetivo de incrementar su solubilidad en agua y evitar su volatilización, el eugenol fue incorporado en SLN por un proceso de homogenización, seguido de una etapa de secado por aspersión o por liofilización. La formulación de SLN compuesta de Campitrol®, Poloxamer 188 y maltodextrina DE10 presentó una buena retención del eugenol. Además, pudo constatarse que la etapa de secado es determinante en la retención de compuestos como el eugenol, ya que la liofilización favoreció su interacción en comparación con el secado por aspersión. Los autores propusieron que este tipo de formulaciones de SLN en forma de polvos pueden facilitar la dosificación de eugenol en productos nutracéuticos durante su preparación (Cortés-Rojas, Souza & Oliveira, 2014).

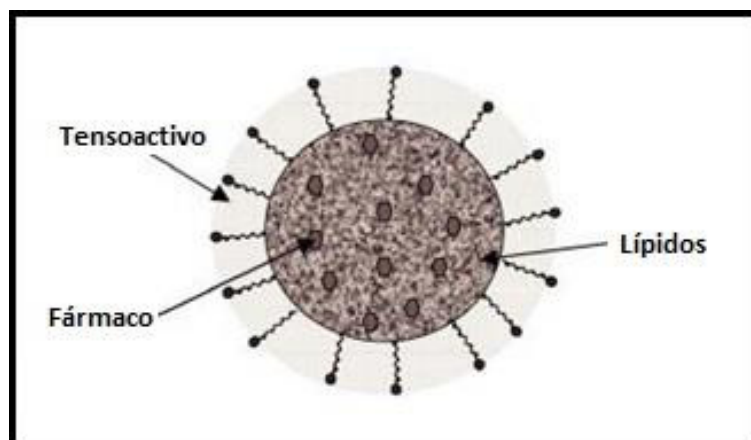


Figura II.2. Estructura de una nanopartícula sólida lipídica.

II.4 β -Ciclodextrinas

El tipo más común de ciclodextrina es el compuesto conocido como β -ciclodextrina (β -CD), el cual consiste en 7 unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,4) que forman una estructura con una cavidad central. A pesar de que la cavidad es básicamente lipofílica y su superficie exterior es hidrofílica, las moléculas acuosas pueden incorporarse a la cavidad de las ciclodextrinas hidratadas (Figura II.3). La cavidad lipofílica de las moléculas de β -CD provee de un microentorno apropiado para ciertas moléculas que pueden internarse y formar complejos de inclusión.

La principal fuerza impulsora para la formación de complejos β -CD-activos (encapsulación) es el desplazamiento de las moléculas de agua por parte de las moléculas hidrofóbicas dentro de la cavidad, debido a la afinidad del entorno. Al aumentar la cantidad de moléculas hidrofóbicas en la cavidad, la asociación apolar-apolar alcanza un nivel óptimo en el que la tensión del anillo de la CD resulta en un estado de energía menor y, por lo tanto, es más estable. Esta propiedad de la β -CD es, precisamente, la que ha sido ampliamente utilizada en las industrias de alimentos, farmacéutica y cosmética, para la encapsulación de compuestos como antioxidantes, vitaminas, aceites esenciales y colorantes. En general, se ha buscado incrementar la solubilidad, mejorar su estabilidad y optimizar la liberación de distintos compuestos.

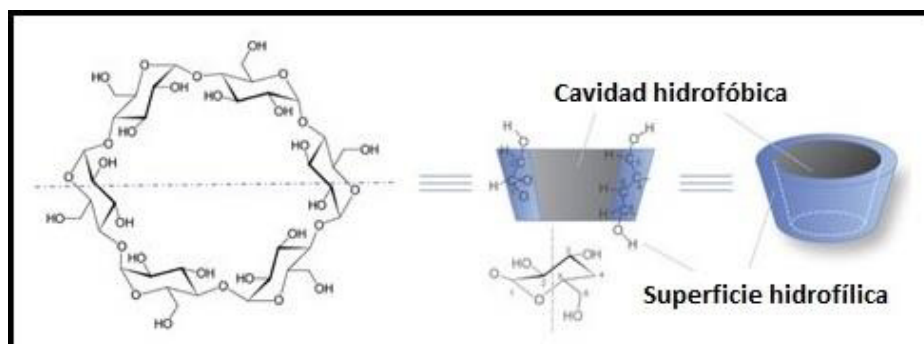


Figura II.3. Estructura de la β -ciclodextrina.

En años recientes, la industria de alimentos ha mostrado gran interés en el desarrollo de formulaciones a base de β -CD y compuestos aislados de extractos naturales. Al ser incorporados en sistemas como las β -CD, compuestos como el d-limoneno, timol y trans-anetol incrementaron diversas propiedades de los alimentos tales como, la calidad de la mezcla de los alimentos, la actividad antimicrobiana, el sabor, la solubilidad y la estabilidad (Fang, Comino & Bhandari, 2013; Kfoury *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2014).

Aceites esenciales también han sido incorporados en β -CD. Por ejemplo, los aceites esenciales de albahaca y estragón, los cuales son ricos en estragol, se encapsularon en diversos tipos de CD (α , β y metilada al azar). Los resultados mostraron que este tipo de sistemas proporcionan una liberación controlada del estragol, así como un incremento en la actividad de captación del radical DPPH y la fotoestabilidad del compuesto incorporado en las CD. Estas formulaciones pueden ser utilizadas en aromaterapia, cosmética y alimentos (Kfoury *et al.*, 2015). Por otra parte, aceites esenciales de canela, ricos en cinamaldehído y timol, han sido incorporados en estos sistemas y se ha comprobado que pueden mejorar la estabilidad de ambos compuestos en condiciones de almacenamiento menores a 84% de humedad relativa y una temperatura de 25 °C (Ponce Cevallos, Buera & Elizalde, 2010).

II.5 Otros Sistemas Particulados de Liberación Controlada

- Nanoemulsiones

Estos sistemas son dispersiones líquidas termodinámicamente estables compuestas de aceite, agua y surfactante, con un tamaño de glóbulo entre 20 y 200 nm. Las nanoemulsiones son preparadas para incrementar la solubilidad de activos farmacéuticos en sistemas acuosos y para proporcionar una liberación controlada del activo en su sitio de aplicación. En este contexto, compuestos como la azadiractina (extraída de *Azadirachta indica*, neem) o aceites esenciales obtenidos de *Cuminum cyminum* han sido incorporados en nanoemulsiones, proporcionando la liberación controlada de los compuestos activos e incrementando la actividad biológica de los mismos (i.e. antioxidante y hepatoprotectora) (Jerobin *et al.*, 2012; Mostafa *et al.*, 2015).

- Micro/nanocomplejos

Con el objetivo de disminuir la susceptibilidad de los productos naturales e incrementar su estabilidad durante el proceso de almacenamiento, la encapsulación en micro/nanocomplejos ha sido aplicada recientemente en la industria de alimentos y nutraceuticos. Dependiendo de la naturaleza del polímero que se utilice, estos sistemas pueden ofrecer mayor adherencia a la superficie de la mucosa intestinal, además de protección y liberación controlada de sustancias naturales activas. Por ejemplo, al ser evaluados *in vitro*, complejos elaborados a base de quitosán y α -tocoferol mostraron una liberación controlada y mayor protección de este compuesto activo en fluido intestinal simulado (Luo *et al.*, 2011). En otro estudio, complejos de alginato o quitosán con aceite esencial de eucalipto presentaron eficiencia de encapsulación entre 90 y 92%, además de una liberación sostenida del aceite (Chang & Dobashi, 2003; Ribeiro *et al.*, 2013).

- Nanogeles

Estos sistemas son redes tridimensionales entrecruzadas de cadenas de polímeros unidos por enlaces covalentes o procesos de autoensamblaje. Los nanogeles son considerados sistemas con mucho potencial debido a su alta capacidad de carga del activo, alta estabilidad y sus propiedades de liberación. Nanogeles elaborados a partir de quitosán y aceite esencial de *Mentha piperita*, rico en ácido cinámico, han sido desarrollados para el

control de *Aspergillus flavus*, mostrando que la incorporación del producto natural en el sistema mantiene e incrementa la actividad antifúngica del mismo (Beyki *et al.*, 2014).

- *Niosomas*

Los niosomas son autoensamblajes vesiculares de surfactantes no iónicos, los cuales son parecidos a los liposomas en su arquitectura y pueden ser utilizados como una alternativa efectiva a los sistemas liposomales debido a su bajo costo, gran estabilidad, facilidad de almacenaje y factibilidad de producción a escala industrial. Un ejemplo de este tipo de sistemas de liberación se desarrolló usando ciertos antioxidantes, como el ácido gálico (AG), curcumina (CU), ácido ascórbico (AA), quercetina (QC) y Tween 60. Las formulaciones mostraron que la coencapsulación de AG/CU y AA/QC influyen en las características químicas y eficiencias de encapsulación de los activos con respecto a las formulaciones simples de cada uno de los antioxidantes. Además, aparentemente, los antioxidantes encapsulados presentaron un incremento en su capacidad para reducir radicales libres, lo cual podría deberse a un efecto sinérgico (Tavano *et al.*, 2014).

II.6 Conclusiones

En los últimos años se han desarrollado diversas formulaciones a base de sistemas nanoparticulados (nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas lipídicas, β -ciclodextrinas, entre otros) con productos naturales, tales como, aceites esenciales, extractos de distintas polaridades y compuestos aislados. Dichas formulaciones presentan características fisicoquímicas especiales, las cuales permiten la aplicación de los productos naturales de una manera más eficiente y segura en comparación con las formas convencionales de administración farmacéutica. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* obtenidos en numerosas investigaciones sustentan el gran potencial que tienen los sistemas nanoparticulados, para ser utilizados en la formulación de activos de origen natural. Estas formulaciones podrían ser utilizadas en diversas aplicaciones industriales incluyendo la alimentaria, la farmacéutica, la agroquímica y la cosmética.

REFERENCIAS

- Álvarez-Román R, Cavazos-Rodríguez MR, Chávez-Montes A, Castro-Ríos R, Waksman de Torres N, Salazar-Cavazos ML, Galindo-Rodríguez SA. 2011. Formulación y caracterización de nanocápsulas con antioxidante natural para su aplicación cutánea. *Química Hoy/Chemistry Science*, 1(4), 29–35.
- Beyki M, Zhavesh S, Khalili ST, Rahmani-Cherati T, Abollahi A, Bayat M, Mohsenifar A. 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 54, 310–319.
- Bhattacharyya SS, Paul S, De A, Das D, Samadder A, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. 2011. Poly (lactide-*co*-glycolide) acid nanoencapsulation of a synthetic coumarin: cytotoxicity and bio-distribution in mice, in cancer cell line and interaction with calf thymus DNA as target. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253(3), 270–281.
- Cavazos-Rodríguez MR. 2011. Encapsulación de moléculas antioxidantes en nanopartículas poliméricas para su aplicación dermatológica. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. México.
- Chang CP, Dobashi T. 2003. Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32(3), 257–262.
- Coradini K, Lima FO, Oliveira CM, Chaves PS, Athayde ML, Carvalho LM, Beck RCR. 2014. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their *in vitro* antioxidant effects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(1), 178–185.
- Cortés-Rojas DF, Souza CRF, Oliveira WP. 2014. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers. *Journal of Food Engineering*, 127, 34–42.
- Das J, Das S, Paul A, Samadder A, Khuda-Bukhsh AR. 2014. Strong anticancer potential of nano-triterpenoid from *Phytolacca decandra* against A549 adenocarcinoma via a

- Ca²⁺-dependent mitochondrial apoptotic pathway. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 7(3), 140–150.
- Das S, Das J, Samadder A, Paul A, Khuda-Bukhsh AR. 2013. Efficacy of PLGA-loaded apigenin nanoparticles in Benzo[α]pyrene and ultraviolet-B induced skin cancer of mice: mitochondria mediated apoptotic signalling cascades. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 62, 670–680.
- Deladino L, Navarro AS, Martino MN. 2013. Carrier systems for yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 163–169.
- Fang Z, Comino PR, Bhandari B. 2013. Effect of encapsulation of D-limonene on the moisture adsorption property of β -cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 164–169.
- Figuerola-Espinoza A. 2014. Incorporación de extractos de semillas de *Annona muricata* L (annonaceae) en nanopartículas poliméricas para su uso en el control de *Aedes aegypti* L (Diptera: Culicidae). Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. México.
- Guerrero-Barbosa A, Álvarez-Román R, Perales-Flores JD, Barajas-Aguilar NC, Ramírez-González E, Galindo-Rodríguez SA. 2014. Nanopartículas poliméricas no biodegradables cargadas con CoQ10 para su potencial aplicación oral. *Química Hoy/Chemistry Science*, 4(3), 1–5.
- Han L, Fu Y, Cole AJ, Liu J, Wang J. 2012. Co-encapsulation and sustained-release of four components in ginkgo terpenes from injectable PELGE nanoparticles. *Fitoterapia*, 83(4), 721–731.
- Herculano ED, de Paula HCB, de Figueiredo EAT, Dias FGB, Pereira V de A. 2015. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 484–491.

- Jerobin J, Sureshkumar RS, Anjali CH, Mukherjee A, Chandrasekaran N. 2012. Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1750–1756.
- Kfoury M, Auezova L, Greige-Gerges H, Ruellan S, Fourmentin S. 2014. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. *Food Chemistry*, 164, 454–461.
- Kfoury M, Auezova L, Ruellan S, Greige-Gerges H, Fourmentin S. 2015. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 118, 156–164.
- Luo Y, Zhang B, Whent M, Yu L, Wang Q. 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its *in vitro* controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 145–152.
- Marc Strasser PN. 2014. Antiulcerogenic potential activity of free and nanoencapsulated *Passiflora serratodigitata* L. extracts. *BioMed Research International*, 2014, 7 pag.
- Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini SM. 2015. Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 203–213.
- Mostafa DM, Kassem AA, Asfour MH, Al Okbi SY, Mohamed DA, Hamed TES. 2015. Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 212, 6–15.
- Pan-In P, Wanichwecharungruang S, Hanes J, Kim AJ. 2014a. Cellular trafficking and anticancer activity of *Garcinia mangostana* extract-encapsulated polymeric nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3677–3686.
- Pan-In P, Tachapruetinin A, Chaichanawongsaroj N, Banlunara W, Suksamrarn S, Wanichwecharungruang S. 2014b. Combating *Helicobacter pylori* infections with mucoadhesive nanoparticles loaded with *Garcinia mangostana* extract. *Nanomedicine*, 9(3), 457–468.

- Paul S, Bhattacharyya SS, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. 2011. Anticancer potentials of root extract of *Polygala senega* and its PLGA nanoparticles-encapsulated form. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, e517204.
- Ponce Cevallos PA, Buera MP, Elizalde BE. 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. Journal of Food Engineering, 99(1), 70–75.
- Ribeiro AF, Ferreira CTG, dos Santos JF, Cabral LM, de Sousa VP. 2015. Design of experiments for the development of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa*. Journal of Nanoparticle Research, 17(2), 1–16.
- Ribeiro JC, Ribeiro WLC, Camurça-Vasconcelos ALF, Macedo ITF, Santos JML, Paula HCB, Bevilaqua CML. 2014. Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. Veterinary Parasitology, 204(3-4), 243–248.
- Ribeiro WLC, Macedo ITF, dos Santos JML, de Oliveira EF, Camurça-Vasconcelos ALF, de Paula HCB., Bevilaqua CML. 2013. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. Experimental Parasitology, 135(1), 24–29.
- Satheesh Madhav NV, Shivani K. 2011. Review on microplate drug delivery system. International Journal of Pharm Tech Research, 3(3), 1242–1254.
- Stecanella LA, Taveira SF, Marreto RN, Valadares MC, de Vieira MS, Kato MJ, Lima EM. 2013. Development and characterization of PLGA nanocapsules of grandisin isolated from *Virola surinamensis*: *in vitro* release and cytotoxicity studies. Revista Brasileira de Farmacognosia, 23(1), 153–159.
- Tachaprutinun A, Meinke MC, Richter H, Pan-in P, Wanichwecharungruang S, Knorr F, Patzelt A. 2014. Comparison of the skin penetration of *Garcinia mangostana* extract

in particulate and non-particulate form. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(2), 307–313.

Tao F, Hill LE, Peng Y, Gomes CL. 2014. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 247–255.

Tavano L, Muzzalupo R, Picci N, de Cindio B. 2014. Co-encapsulation of antioxidants into niosomal carriers: Gastrointestinal release studies for nutraceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 82–88.

CAPÍTULO III:

DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CON CLOFAZIMINA Y ENSAYOS *IN VITRO* CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CON CLOFAZIMINA Y ENSAYOS *IN VITRO* CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

III.1 Introducción

La tuberculosis es una enfermedad con una incidencia de 9 millones de casos nuevos y cerca de 1.5 millones de muertes al año (World Health Organization, 2016). Aunado a esto, el desarrollo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* farmacorresistentes (las cuales no responden a los tratamientos convencionales) han incrementado la problemática que concierne a esta enfermedad (World Health Organization, 2006). Durante la última década, se han buscado estrategias que ayuden a la erradicación de la enfermedad, dentro de las que destacan el uso de nanoacarreadores de fármacos antituberculosos con la finalidad de incrementar los efectos terapéuticos de los mismos (Xie *et al.*, 2014).

Dentro de los nanoacarreadores mejor estudiados y con un futuro prometedor encontramos a las nanopartículas poliméricas (NP). Este tipo de acarreadores farmacéuticos generalmente constituidos de polímeros biodegradables naturales o sintéticos, forman estructuras con naturaleza química diversa, dónde el fármaco puede estar encapsulado, adherido o absorbido (Jain Kewal K., 2012). Su tamaño nanométrico (100-300 nm) les confiere características únicas tales, como: i) amplia superficie de contacto, ii) posibilidad de biodireccionamiento a órganos/tejidos específicos e iii) internalización por parte de células, bacterias o parásitos (Nasiruddin, Neyaz, & Das, 2017).

Existen estudios de formulaciones a base de NP elaboradas con polímeros biodegradables como ácido poliláctico (PLA) o ácido poliláctico-*co*-glicólico (PLGA), donde se encapsulan fármacos antituberculosos de primera línea, tales como rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), etambutol (ETO) o isoniazida (INA) (Ahmad, Pandey, Sharma, & Khuller, 2006; Kumar *et al.*, 2011; Pandey, Rajesh & Kuller, G.K., 2004; Sharma, Pandey, Sharma, & Khuller, 2004). Estas formulaciones han demostrado incorporar los distintos fármacos con una eficiencia de encapsulación entre 60 y 90%, así como una actividad antituberculosa eficiente al aplicarse por distintas vías (intravenosa, respiratoria), tanto *in*

vitro, como *in vivo*. Cabe mencionar que en estudios de toxicidad, las formulaciones muestran perfiles adecuados y de baja toxicidad cuando se aplican en organismos vivos (Pandey, Zahoor, Sharma, & Khuller, 2003; Sharma, Sharma, & Khuller, 2004). Con lo anterior, es evidente que las formulaciones con NP cuentan con potencial para ser utilizadas en el tratamiento convencional de la tuberculosis, sin embargo, no hay suficientes estudios relacionados con la eficiencia antimicobacteriana de antituberculosos de segunda línea incorporados a NP. En este contexto, el uso de fármacos de segunda línea (p.e. clofazimina, CFM) en nanoformulaciones que modulen su toxicidad o efectos adversos en el organismo representan una excelente opción (Pandey & Ahmad, 2011).

La CFM, es un fármaco de segunda línea que se utiliza para el tratamiento de la lepra y ha demostrado gran eficiencia cuando se ha utilizado en tratamientos de tuberculosis (Arbiser & Moschella, 1995). Sin embargo, su carácter altamente lipofílico ($\text{LogP} = 7.4$), provoca efectos secundarios severos, tales como su deposición en tejido adiposo, piel, conjuntiva o epitelio intestinal (cristalización) cuando se administra por períodos largos en humanos, lo que en primera instancia complica su aplicación en el tratamiento de enfermedades con esquemas terapéuticos prolongados, como la tuberculosis (Peters, Hamme, & Gordon, 1982). No obstante, se han hecho diferentes intentos de formulaciones diseñadas para la aplicación de la CFM con el objetivo de disminuir sus efectos adversos y así ser aplicada en el tratamiento de la tuberculosis, incluyendo liposomas, nanosuspensiones, nanoagregados o ciclodextrinas (Gomez-Flores, Tucker, Kansal, Tamez-Guerra, & Mehta, 1997; Hernandez-Valdepeña *et al.*, 2009; Mehta, 1996; Peters K. *et al.*, 2000; Salem, Steffan, & Düzgünes, 2003; Schwinté, Ramphul, Darcy, & O'Sullivan, 2003). Estas formulaciones han demostrado una eficiente actividad antimicobacteriana, pero estabilidad limitada en períodos cortos de tiempo cuando se almacena la formulación y en ocasiones, liberación limitada del activo incorporado. Además, al ser formulaciones basadas en partículas de un tamaño alrededor de los 300-500 nm o más, aumenta el riesgo de provocar trombos al ser aplicados en organismos mayores (Kaur, Bhandari, & Yakhmi, 2014). Estos efectos adversos, pueden ser disminuidos e incluso nulos con el uso de NP biodegradables cargadas con el fármaco. La incorporación de un fármaco con características fisicoquímicas tan particulares, como lo es la CFM, en un sistema nanoparticulado permitiría no sólo disminuir los efectos

secundarios que se presentan por la baja solubilidad acuosa del fármaco (deposición y cristalización), sino también, la posibilidad de aplicar por vías alternas a la oral (p.e. pulmonar, intravenosa).

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue diseñar, desarrollar y elaborar una formulación de NP biodegradables cargadas con CFM (NP-CFM) para ser utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis.

III.2 Materiales

Se utilizó PLA (Purasorb Purac Biochem, Gorinchem, Holanda) como polímero formador de las NP, CFM (SIGMA-Aldrich, USA) como fármaco estándar, Alcohol Polivinílico (PVA), Poloxamer (Pluronic F127) Acetonitrilo (ACN) grado HPLC marca JT Baker, Metanol (MET) grado HPLC (Tedia), Ácido Fórmico (AF) grado HPLC (Merck Millipore). Los demás reactivos y solventes fueron grado analítico.

III.3 Metodología

Elaboración de las nanopartículas poliméricas. Las NP se prepararon por la técnica de nanoprecipitación descrita por Fessi *et al.* (1989). Brevemente, se utilizó una fase orgánica compuesta de una mezcla de solventes (miscibles con agua) con PLA y CFM, la cual fue inyectada en una fase acuosa (FA, 20 ml) que contenía PVA o Poloxamer bajo agitación magnética constante. La difusión de la FO en el seno de la FA favoreció la agregación del polímero formador, atrapando así a la CFM en su interior y dejando a las NP en suspensión. La suspensión obtenida se sometió a evaporación a presión reducida (Rotaevaporador Laborota 4003 control, Heidolph, Alemania) para la eliminación de los solventes. Una vez obtenidas las NP libres de solventes y con el fin de concentrarlas, se sometieron a centrifugación (Allegra TM 64R Centrifuge, Beckman Coulter, USA) a 25,000 rpm durante 2.5 h. Finalmente, la pastilla obtenida se sometió a un proceso de liofilización (Liofilizadora Freezone 2.5, LABCONCO, USA).

Caracterización física de las nanopartículas poliméricas. A las formulaciones de NP se les determinó su tamaño promedio e índice de polidispersidad (PDI) por espectroscopia de correlación fotónica, así como el potencial zeta (ζ) por microelectroforesis con láser Doppler en un Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA).

Perfil calorimétrico de las nanopartículas poliméricas. El análisis térmico de las NP se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los análisis se realizaron con un calorímetro (DSC Q200, TA Instrument, USA), utilizando un estándar de indio (previamente analizado, bajo las mismas condiciones de la muestra) como referencia. Para el análisis de los materiales (polímero, tensoactivo y fármaco), las NP blanco y las NP-CFM se pesaron de 4-5 mg de cada una de las muestras y se colocaron en un crisol de aluminio. La prueba se realizó en un rango de temperatura de 25 a 250°C con una tasa de calentamiento de 10°C. Cada muestra se analizó por duplicado.

Desarrollo y validación del método analítico por CLAR para la cuantificación de la CFM. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos a alta resolución con un detector de UV con arreglo de diodos (PolychromVarian 9065) y una columna fase reversa C18 (ZORBAX Eclipse XDB, Agilent). Se preparó una curva de calibración de CFM, a partir de una solución patrón, a seis niveles de concentraciones (de 5 a 30 µg/mL.) y la detección se realizó a 282 nm. Posteriormente se evaluó la precisión, el coeficiente de correlación (r^2), el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC), siguiendo el protocolo marcado por EURACHEM (B. Magnusson & U. Ornemark, 2014).

Cuantificación de la clofazimina incorporada en las nanopartículas poliméricas. Un lote de NP-CFM se disolvió en un volumen conocido en una mezcla de solventes. Posteriormente, las soluciones se analizaron por el método de CLAR previamente desarrollado. Finalmente, se determinó el porcentaje de encapsulación (% E) y de eficiencia de encapsulación (% EE) en base a las siguientes fórmulas:

$$\% E = \frac{(\text{mg})\text{CFM cuantificada en NP liofilizadas}}{(\text{mg})\text{NP liofilizadas}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% EE = \frac{(\text{mg})\text{CFM en lote completo de NP liofilizadas}}{(\text{mg})\text{CFM en FO}} \times 100 \quad (2)$$

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR). El estudio de FT-IR de las formulaciones obtenidas se realizó con la finalidad de establecer algún tipo de interacción entre los componentes de las NP. Distintas muestras fueron colocadas en el

porta muestras. Los espectros del PLA, tensoactivo (PVA), NP blanco y NP-CFM optimizados fueron obtenidos en un rango de 400-4000 cm^{-1} y con 1 cm^{-1} de resolución (Espectrómetro FT-IR FRONTIER, Perkin-Elmer, USA).

Pruebas de liberación in vitro de las nanopartículas poliméricas cargadas. Inicialmente, se pesó una cantidad conocida de NP cargadas y se resuspendió en el medio de liberación. El seguimiento de la liberación se llevó a cabo durante 28 h, tomando muestras a tiempos previamente establecidos. Las muestras se analizaron con el método por CLAR previamente desarrollado.

Determinación de la actividad antituberculosa de las nanopartículas poliméricas por la técnica de AMBA. Con el fin de conocer la actividad antituberculosa de las NP cargadas con CFM, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de Azul de Alamar en Microplaca (AMBA). Previamente, se cultivó la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* HRv37 (ATCC 27294) en caldo de cultivo Middlebrook 7H9 a 37 °C durante dos semanas. Después de purificar, los lotes se esterilizaron y, además, se preparó una solución estándar de CFM en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Inicialmente, en una placa de 96 pocillos, se colocaron 200 μl de agua destilada estéril en los pocillos de la periferia y 100 μl de caldo de cultivo Middlebrook 7H9 en los pocillos de prueba. Se agregaron 100 μl de las suspensiones de NP estériles y la solución estándar de CFM en los pocillos de concentración más alta. Posteriormente, se realizaron diluciones consecutivas 1:2 a lo largo de la placa y se agregaron 100 μl del cultivo previamente preparado. Simultáneamente se prepararon tres controles de la población bacteriana (100, 10 y 1%). Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días, se les agregó 20 μl de colorante de azul de alamar y 12 μl de Tween 80 al 10 % (v/v) en los pocillos de prueba. Las placas se reincubaron a 37°C durante 24 h. Después de esta incubación se buscó el cambio de color en el colorante de azul a rosa. Finalmente, se determinó la CMI para cada una de las formulaciones.

III.4 Resultados y Discusión

Elaboración de nanopartículas poliméricas. Con la finalidad de obtener una formulación versátil para distintas vías de administración, se estableció el tamaño de las NP (≤ 200 nm) como parámetro principal a seguir; un tamaño de partícula por debajo de los 200 nm garantiza que al ser aplicadas por vía intravenosa, éstas no formen trombos y se asegura una mayor biodistribución y biodisponibilidad, aumentando sus efectos terapéuticos (Bhatia, 2016). Uno de los factores que más influye en el tamaño de partícula es el solvente presente en la FO. La Tabla III.1, muestra las observaciones y resultados obtenidos para cada una de las modificaciones realizadas durante la elaboración de las NP. Como se aprecia, si bien se obtuvo un tamaño de partícula adecuado (138 a 196 nm) con los solventes probados por separado, la presencia de agregados de polímero fue persistente en la mayoría de los casos. Únicamente, la FO compuesta por acetona presentó un tamaño superior (640 nm). Este comportamiento se atribuye a las diferencias de solubilidad del polímero en los distintos solventes, así como la interacción del solvente con el agua al momento de llevar a cabo la inyección de la FO en la FA, y por ende en el proceso de difusión y posterior formación de las NP (Galindo-Rodriguez, Allémann, Fessi, & Doelker, 2004). Para evitar la formación de agregados y pérdidas de polímero, así como aumentar el rendimiento de nanoencapsulación, se probó el uso de mezclas de solventes. De todas las mezclas probadas (Tabla III.1), sólo con la mezcla de etanol-acetona se logró obtener un tamaño de partícula adecuado (163 nm), con índice de polidispersidad aceptable (0.145) y sin presencia de agregados en el lote final.

Otros autores, han recurrido a la mezcla de solventes para eficientizar la nanoprecipitación, ya que al tener la mezcla de dos solventes con diferente grado de miscibilidad y solubilidad del polímero el proceso de difusión del conjunto en el seno acuoso se lleva de manera “regulada”, lo que permite una correcta formación de las NP y evita la formación de agregados (Alshamsan, 2014).

Una vez que se estableció la mezcla de solventes adecuada para la obtención de las NP, se probaron dos tensoactivos. Como se puede observar en la Tabla III.1, si bien no hubo influencia de la concentración de tensoactivo (PVA o Poloxamer) sobre el tamaño de nanopartícula (160 a 167 nm empleando los dos tensoactivos, respectivamente), son las

formulaciones elaboradas con PVA las que presentaron menor PDI, lo cual sugiere que con este tensoactivo, de manera general, el tamaño es más uniforme entre la población de partículas (PDI= 0.040). En estudios anteriores, se estableció que el PVA es un surfactante polimérico que al depositarse en la superficie de la red polimérica en la NP disminuye la tensión interfacial, favoreciendo la formación de partículas de tamaño similar y con mayor estabilidad durante el proceso de nanoprecipitación (Sharma, Madan, & Lin, 2016).

Tabla III.1. Modificaciones a la técnica de nanoprecipitación para la obtención de las NP biodegradables de PLA cargadas con clofazimina.

Cambios en la formulación			Tamaño (nm)	PDI ▪	Observaciones
Solvente	Metanol		196	0.159	Δ
	Etanol		179	0.130	Δ ●
	Isorpropanol		138	0.144	Δ ●
	Acetona		640	0.127	Δ
Mezcla de Solventes	Metanol-Etanol		ND	ND	Δ ●
	Metanol-Isopropanol		ND	ND	Δ ●
	Etanol-Isopropanol		ND	ND	Δ ●
	Etanol-Acetona		163	0.145	Sin presencia de agregados, ni capa de cristales en superficie de lote final
	Acetona-Isopropanol		ND	ND	*
Concentración (%) y Tipo de Tensoactivo	Poloxamer	0.5	167	0.133	
		1	163	0.145	
	Alcohol polivinílico	0.5	165	0.070	
		1	160	0.040	
Concentración de fármaco (μg/ml)	83		161	0.070	Sin presencia de agregados, ni capa de cristales en superficie de lote final
	167		175	0.188	Δ ●
	233		189	0.175	Δ ●

Δ Presencia de agregados.

● Capa de aceite en superficie de lote final.

* Formación de agregados desde inyección de FO en FA (No determinado).

▪ Rango de valor aceptable = 0.000 a 0.200

En cuanto a la influencia de la concentración de CFM presente en la FO, fue posible observar que conforme se aumentó la cantidad de fármaco, hubo una tendencia a la formación de agregados de polímero y aparición de cristales de fármaco en la superficie del lote total. Estos indicios mostraron, cierta interacción no favorable por parte de los elementos de la formulación (polímero y fármaco) cuando se sobrepasa el punto de equilibrio entre ambos durante la difusión y posterior formación de las NP. La CFM es un fármaco altamente hidrofóbico, con limitada solubilidad en soluciones básicas y en solventes orgánicos se encuentra sin carga (O'Connor, O'Sullivan, & O'Kennedy, 1995). En conjunto, estos factores limitaron la solubilidad de la CFM en la FO, compuesta por etanol-agua. Los resultados mostraron que cuando se emplearon concentraciones más altas de CFM (p.e. 167 y 233 $\mu\text{g/ml}$), probablemente, una fracción del fármaco difundió con el solvente hacia la fase acuosa en la que precipitó formando cristales en la superficie de la dispersión, con lo que se estableció que la FO con una carga de fármaco igual a 83 $\mu\text{g/ml}$ era la adecuada para llevar a cabo la elaboración de las NP-CFM. Por su parte, considerando el proceso de formación de las NP, la presencia del PLA en una concentración de 3.33 mg/ml fue idónea, ya que permitió el atrapamiento de la CFM dentro de la red polimérica de manera simultánea a la agregación del mismo durante la difusión de la FO en la FA, obteniendo NP-CFM con características de tamaño deseado, PDI bajo y evitando la formación de agregados.

Una vez que se establecieron las condiciones que permitieron la obtención de una formulación adecuada, se procedió a la caracterización física de las NP biodegradables blanco (sin fármaco) y las cargadas con CFM. De manera general, los parámetros de tamaño y PDI establecidos durante el proceso de formulación se mantuvieron en las repeticiones de lotes blanco (sin fármaco) y en los lotes con fármaco (Tabla III.2). Para las NP blanco se determinó un tamaño de 166 ± 17 nm y un PDI aceptable con valor de 0.145 ± 0.17 . Por su parte, las NP-CFM mostraron un tamaño de 170 ± 20 con PDI de 0.136 ± 0.26 . Así mismo, no se observó una diferencia significativa en el tamaño de partícula entre los lotes sin o con fármaco, señalando que la incorporación del fármaco no altera de forma importante este parámetro. Además, las NP-CFM mostraron una carga superficial de -18.80 mV (Tabla III.2). Este valor de potencial Z se correlaciona de manera estrecha con la estabilidad de las NP en suspensión; al presentar un valor negativo, como

en ésta formulación, se asegura que las propiedades coloidales de la misma permanecerán al ser depositadas en un sistema acuoso (Honary, Sohely & Zahir, Foruhe, 2013).

Tabla III.2. Caracterización física de las NPS biodegradables blanco y cargadas con clofazimina.

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Ψ_z (mV)
NP-BCO	166 ± 17	0.145 ± 0.17	ND
NP-CFM	170 ± 20	0.136 ± 0.26	-18.80 ± 6.60
NP-CFM Liofilizadas	147 ± 9	0.176 ± 0.14	ND

$n = 6; \bar{x} \pm \sigma$

De manera particular, otro de los aspectos importantes a establecer durante el diseño de nanoformulaciones con potencial aplicación clínica es que la formulación tenga capacidad para ser liofilizada, se pueda almacenar por períodos de tiempo prolongado mostrando estabilidad fisicoquímica y que pueda ser resuspendida en solución sin presencia de agregados (Fonte, Reis, & Sarmento, 2016). Considerando lo anterior, un lote de NP-CFM liofilizado (sin sustancias lioprotectoras) se mantuvo en almacenamiento a temperatura ambiente durante dos años y posteriormente, se determinó el tamaño de partícula y PDI de las NP-CFM resuspendidas en agua destilada. Los resultados demostraron (Tabla III.2) que fue posible recuperar el tamaño de partícula al resuspender las NP-CFM en agua destilada después de un proceso de liofilización y almacenaje largo (dos años), registrando valores de 147 nm y 0.176 para el tamaño y PDI, respectivamente. Este resultado es altamente favorable, ya que no sólo se tiene una nanoformulación con características fisicoquímicas adecuadas al momento de su preparación, sino que, después de pasar por un proceso de liofilización (sin lioprotectores) y almacenaje a largo plazo (por dos años), la nanoformulación recupera estas características físicas sin presencia de agregados durante su resuspensión en un sistema acuoso.

Desarrollo y validación del método analítico por CLAR para la cuantificación de la clofazimina. Las NP están constituidas por matrices poliméricas y agentes tensoactivos que dificultan la cuantificación directa del activo incorporado, haciendo indispensable el uso de técnicas cromatográficas validadas. Específicamente, se desarrolló y validó un método por CLAR para la cuantificación de CFM a partir de las nanoformulaciones. La Tabla III.3 muestra los parámetros de validación obtenidos para el método de cuantificación. Se estableció que el intervalo de concentraciones de 5 a 30 µg/mL es lineal, con un coeficiente de correlación lineal superior a 0.99. Con respecto a la precisión, el método está dentro de los parámetros de aceptación establecidos y coincide con otros resultados previamente reportados, donde también se cuantifica CFM (Queiroz, Pereira, Gotardo, Cordeiro, & Melchior, 2003). En relación a los límites de detección y de cuantificación establecidos en éste método, coinciden con otros resultados reportados para métodos analíticos para cuantificar CFM por CLAR a partir de muestras biológicas (Peters et al., 1982; Srikanth, Joshi, Bikkasani, Porwal, & Gayen, 2014). Con dichos resultados se logró obtener un método de cuantificación adecuado y confiable para la cuantificación de CFM a partir de las nanoformulaciones elaboradas durante este trabajo.

Tabla III.3. Parámetros de validación establecidos para la cuantificación de CFM por CLAR.

Parámetro	Valor
Precisión (% DER)	7.89
Coefficiente de Correlación (r^2)	0.99
Límite de Detección (ng/mL)	3.2
Límite de Cuantificación (ng/mL)	9.7

Determinación del % E y % EE de la clofazimina incorporada en las nanopartículas poliméricas. Una de las partes más importante dentro del desarrollo de una formulación farmacéutica es la cuantificación del activo presente. Particularmente, para la nanoformulación que se desarrolló en este trabajo, este parámetro permitió diseñar los protocolos adecuados para la evaluación microbiológica de la misma. Así, para las NP cargadas con CFM obtenidas por la técnica de nanoprecipitación se calculó el % E y el % EE por método de cuantificación descrito con anterioridad (Tabla III.3). El % EE que se obtuvo para la formulación fue de 62.50 (Tabla III.4). Dicho valor es similar al reportado para otras formulaciones de NP biodegradables elaboradas con otros agentes antituberculosos, tales como, RIF, PZA, INH, para los cuales se reportan % EE de 58.99, 68.02 y 66.31%, respectivamente, o incluso es un valor mayor cuando se compara con el reportado para NP elaboradas con ETO (35.2%) (Ahmad *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011; Pandey, Rajesh & Kuller, 2004; Sharma, Pandey, *et al.*, 2004; Tripathi, Akansha, Gupta, Ranjana, & Saraf, 2010). Por su parte el % E para las NP biodegradables cargadas con CFM fue de 2.05%. Este valor si bien es bajo, es consistente con las características fisicoquímicas del fármaco. La CFM es un fármaco altamente hidrofóbico, lo cual dificulta su incorporación en una formulación. Con anterioridad, se ha intentado incorporar a este fármaco en distintos sistemas de liberación, por ejemplo liposomas, ciclodextrinas, nanoagregados, micelas o nanosuspensiones, pero dichas formulaciones presentan desventajas como baja incorporación del fármaco (micelas) (Fahelbom, Kahiri, Timoney, & Corrigan, 1993), formación de agregados durante proceso de elaboración (nanosuspensión) (Peters, *et al.*, 2000), baja absorción del fármaco encapsulado después de aplicarlo oralmente (implantes) (Kailasam, Subramanian, Wise, & Gangadharam, 1994) poca estabilidad de la formulación (liposomas) (Mehta, 1996), pobre liberación del fármaco a partir del sistema (nanoagregados) (Hernandez-Valdepeña *et al.*, 2009) e inclusive una actividad antituberculosa pobre o limitada (nanoagregados y ciclodextrinas) (Hernandez-Valdepeña *et al.*, 2009; Salem *et al.*, 2003). En contraste, la nanoformulación desarrollada en este trabajo ofrece otra forma de incorporación y administración de un fármaco altamente hidrofóbico, como lo es la clofazimina, en un sistema que presenta alta homogenidad de tamaño y estabilidad coloidal. Adicionalmente, después de un proceso de liofilización, las NP-CFM mostraron una alta capacidad de

reesuspensión en agua al recuperar el tamaño de partícula con valor de 147 nm y PDI de 0.176 (Tabla III.2), lo cual podría reflejarse en mayor estabilidad de almacenaje y facilidad de aplicación por diversas vías de la nanoformulación.

Tabla III.4. Cuantificación de CFM incorporada en las NP biodegradables.

Parámetro	Valor
% Encapsulación	2.05 ± 0.20
% Eficiencia de Encapsulación	62.50 ± 2.16

$n = 6; \bar{x} \pm \sigma$

Perfil calorimétrico de las nanopartículas poliméricas. El análisis térmico de las NP elaboradas permite establecer la conformación del sistema nanoparticulado y en un futuro predecir el comportamiento de las NP durante las pruebas de liberación *in vitro* y parámetros relacionados con la estabilidad de los componentes. La Figura III.1 muestra el análisis por DSC tanto para los materiales utilizados como las NP blanco y cargadas con CFM. En los termogramas obtenidos para las NP blanco y cargadas con CFM fue posible observar dos picos endotérmicos a los 43.61 y 150.33°C, correspondientes a la temperatura de transición vítrea y de fusión del PLA, respectivamente; además se observa un pico de características exotérmicas a los 116.52°C correspondiente a la cristalización del polímero (Figura III.1-D). Dichas señales aparecen en el perfil calorimétrico individual del PLA (Figura III.1-B). Éstos comportamientos coinciden con los reportados en otros trabajos (Gregorova, Adriana, 2013; TA Instruments, USA, 2007). Particularmente, la CFM presenta un comportamiento endotérmico a los 224.58 °C, correspondiente a la temperatura de fusión del fármaco (Figura III.1-A) (Wisam, Mansor, Emad, & Nor Azowa, 2010). La ausencia de esta señal en el perfil de la nanoformulación de CFM puede atribuirse al hecho de que el fármaco se encuentra en estado amorfo dentro de las NP (Figura III.1-D) (Mandal, Bostanian, Graves, Chapman, & Womack, 2002). En conjunto, el análisis calorimétrico de las NP biodegradables cargadas con clofazimina

sugiere que la mayor cantidad de CFM se encuentra inmersa en la red compleja del PLA, con un acomodo al azar dentro de la NP.

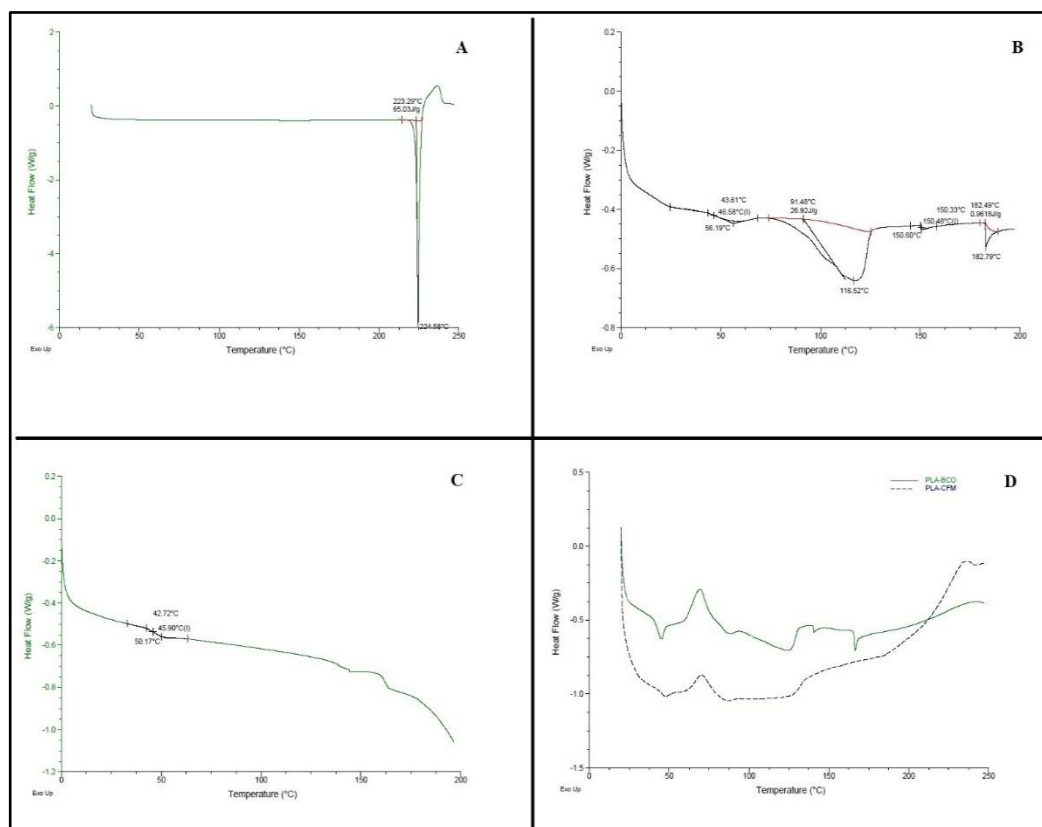


Figura III.1. Perfiles calorimétricos para los materiales y nanoformulaciones por DSC. A) Clofazimina, B) PLA, C) PVA y D) NP-blanco y NP-CFM.

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR). Para determinar si existen nuevas interacciones entre los componentes de las NP, se analizaron diversas muestras por espectroscopía FT-IR. En la Figura III.2, se muestran los espectros de IR obtenidos para el tensoactivo (PVA), el polímero PLA, la clofazimina, las NP blanco y las NP cargadas.

Inicialmente, se analizaron los espectros para cada uno de los componentes de las NP (PVA, PLA y CFM). Como se puede observar, para el espectro IR del PVA (Figura III.2-A) sobresale una banda alrededor de los $3,400\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo *OH* del segmento alcohólico en la cadena polimérica. Además, la banda presente a los $2,900\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la presencia de grupos *CH*. Por su parte, la banda alrededor de los $1,750$

cm^{-1} se atribuye a la presencia de grupos $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}-\text{O}$, correspondientes al grupo acetato restante del PVA

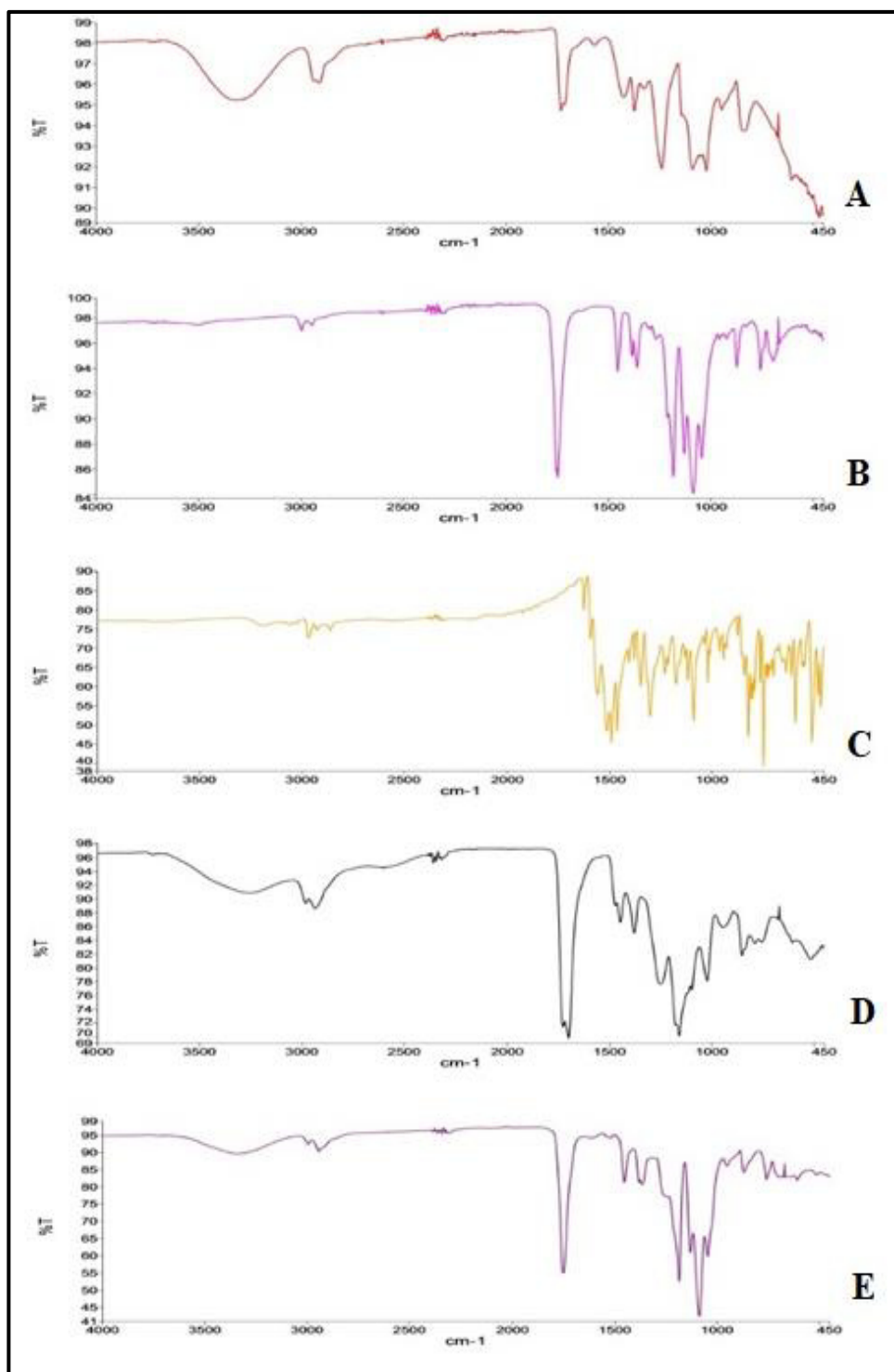


Figura III.2. Espectros de IR con transformada de Fourier: A) PVA, B) PLA, C) CFM, D) NP blanco y E) NP-CFM.

(Krimm, Liang, & Sutherland, 1956). Para el caso del espectro del polímero PLA (Figura III.2-B), se observó la presencia de dos bandas importantes, a los $2,900\text{ cm}^{-1}$ relacionada a la presencia de grupos CH_2 y otra alrededor de los $1,750\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a las vibraciones de los carbonos $C=O$ y $C-O$, lo cual puede señalar la presencia del grupo éster en la estructura de la cadena polimérica (Hoidy, Wisam H., Ahmad, Mansor B., Jaffar Al-Mulla, Emad A., & Ibrahim, Nor Azowa Bt., 2010). En cuanto al espectro IR de la clofazimina (Figura III.2-C), se pudieron observar bandas de poca intensidad entre los $2,900$ y $3,200\text{ cm}^{-1}$, las cuales pueden atribuirse a la presencia de grupos CH dentro de un anillo aromático. La banda intensa a los $1,500\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a la presencia de grupos $C=C$ en resonancia (anillo aromático). Finalmente, para las bandas obtenidas dentro de la huella del compuesto, se puede observar la presencia de grupos correspondientes a aminas terciarias (de $1,000$ a $1,200\text{ cm}^{-1}$) (O'Driscoll & Corrigan, 1992).

Posteriormente, se analizaron preparaciones de las NP blanco (Figura III.2-D) y NP-CFM (Figura III.2-E). De manera general, las NP blanco y cargadas no presentan diferencia en el espectro IR, salvo por la intensidad de las bandas, la cual es mayor en el espectro de las NP blanco. Además, no hay aparición de nuevas bandas correspondientes a la formación de nuevos compuestos, lo cual indica que sólo hay interacción química entre los compuestos formadores de las NP. En ambos espectros sobresalen las bandas a los $3,400$, $2,900$ y $1,750\text{ cm}^{-1}$, que corresponden a la presencia del grupo OH (PVA), grupos CH y CH_2 (PVA, PLA, CFM), así como grupo $C=O$ y $C-O$ (PVA, PLA), respectivamente. Particularmente, en el espectro de las NP cargadas con CFM, se puede observar dentro de la región huella bandas agudas en la región de $1,000$ a $1,250\text{ cm}^{-1}$, las cuales se pueden atribuir a la presencia de aminas terciarias (presentes en el espectro del fármaco solo).

Ensayo de liberación in vitro de las nanopartículas poliméricas blanco y cargadas con clofazimina. Establecer el perfil de liberación de fármacos a partir de sistemas como las NP representa uno de los aspectos más importantes a estudiar, ya que otorgan indicios sobre el posible comportamiento farmacocinético *in vivo* por parte de la nanoformulación. La Figura III.3 presenta el perfil de liberación de las NP biodegradables cargadas con CFM. En el período analizado (0-28 h), se observó una liberación inicial que alcanzó hasta un 50 % de fármaco liberado en un período de 5 h, posiblemente atribuible a un efecto

burst, generalmente correlacionado con la liberación inmediata de las moléculas de CFM que se encuentran adsorbidas al sistema nanoparticulado. Al no encontrarse unidas covalentemente al polímero, éstas moléculas de CFM, se encuentran disponibles para ser solubilizadas fácilmente en el medio de disolución (Huang & Brazel, 2001). Posteriormente, se observó una segunda etapa con liberación más paulatina y estable que abarcó de las 5 a 28h, donde se alcanzó una liberación final del 73 % de fármaco a partir de las NP.

Este comportamiento de liberación sostenida puede atribuirse a los mecanismos de degradación del polímero que se dan a lugar en períodos más prolongados. Posteriormente, se observó una segunda etapa con liberación más paulatina y estable que abarcó de las 5 a 28 h, donde se alcanzó una liberación final del 73 % de fármaco a partir de las NP. Este comportamiento de liberación sostenida, puede atribuirse a los mecanismos de degradación del polímero que se dan a lugar en períodos más prolongados. El PLA es un polímero con un mecanismo de liberación basada en el proceso de su degradación. Inicialmente, al entrar en contacto con una solución acuosa, las NP de PLA comenzarán un proceso de absorción del medio de liberación a través de canales, en los cuales se dará lugar a la formación de poros, por los cuales las moléculas de CFM pueden difundir al medio acuoso. Al mismo tiempo, las moléculas de agua comienzan a hidrolizar la molécula de polímero, rompiendo los enlaces éster y acidificando el medio, formando cadenas de PLA con menor peso molecular. Finalmente, la constante formación de poros, la hidrólisis y acidificación del medio durante un tiempo prolongado, da lugar a la erosión (desprendimientos de bloques completos de polímero) del sistema nanoparticulado, la cual termina por liberar las moléculas de CFM que se encuentran en capas más internas, cercanas al centro de la NP (Fredenberg, Wahlgren, Reslow, & Axelsson, 2011). En resumen, estos mecanismos fisicoquímicos rigen la estabilización y prolongación de la liberación de fármacos en los sistemas nanoparticulados biodegradables, como se puede observar en este caso a partir de las 5 horas de liberación (Figura. III.3).

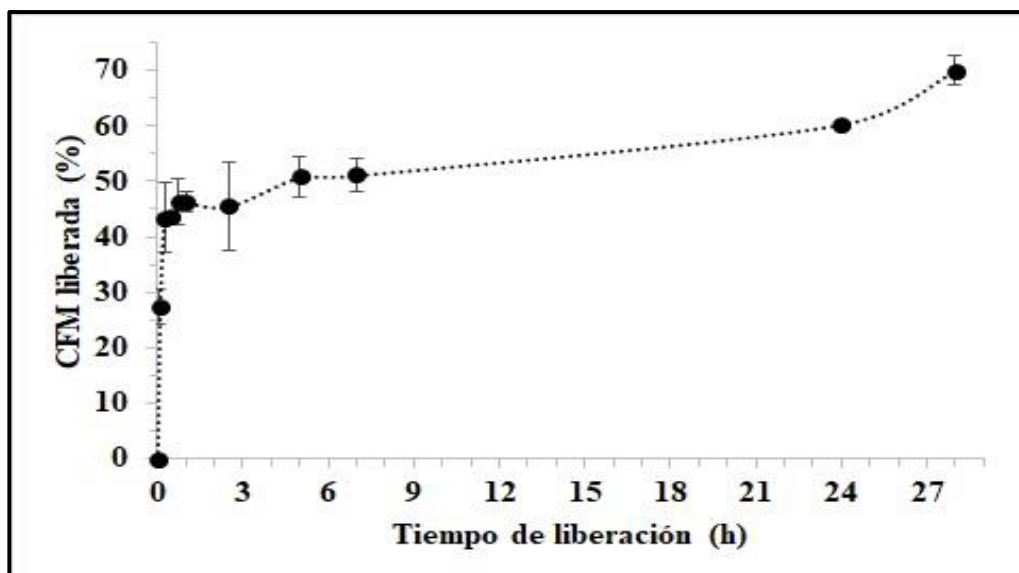


Figura III.3. Perfil de liberación *in vitro* para las NP biodegradables cargadas con CFM (n=2, $\bar{x} \pm DS$).

Así, el perfil de liberación mostrado por esta formulación es un resultado prometedor. El hecho de poder observar una liberación paulatina de la CFM a partir de las NP permite establecer pautas, no sólo para mejorar la nanoformulación, sino también, para establecer técnicas de seguimiento y estudio a éste novedoso tipo de formulaciones.

Determinación de la actividad antituberculosa de las NP. Con el fin de determinar la actividad antituberculosa de la clofazimina después del proceso de encapsulación y determinar la CMI para la formulación de NP cargadas se utilizó la técnica de AMBA en microplaca (Tabla III.5).

Es bien conocida la actividad antituberculosa *in vitro* e *in vivo* de la CFM ante cultivos no solo de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, sino también contra cultivos de *M. avium*, *M. bovis* y *M. avium-intracelular* (Novartis Pharmaceuticals Corporation, 2006; Reddy, Nadadhur, Daneluzzi, O'Sullivan, & Gangadharam, 1996). Sin embargo, los efectos secundarios (coloración amarillenta en tejido adiposo, conjuntiva y piel) y su poca absorción intestinal han dado pie a la búsqueda de nuevas formulaciones que permitan su aplicación eficiente.

Tabla III.5. Determinación de CMI *in vitro* para el fármaco libre y las formulaciones de NP (blanco y cargadas) contra *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

Formulación	CMI (ng/mL)
CFM-Libre	136 ± 50.43
NPS-BLANCO	No presentó actividad
NPS-CFM	123.84 ± 82.32

$n = 9; \bar{x} \pm \sigma$

Así, en el ensayo *in vitro* realizado en este trabajo (Tabla III.5), se estableció una CMI para el fármaco libre alrededor de los 137 ng/mL. Dicho valor concuerda con el registrado para este fármaco cuando se ensayó *in vitro* contra *M. tuberculosis H37Rv* (100 ng/mL) (Global Alliance for TB Drug Development, 2008). Además, se probaron preparaciones de NP biodegradables blanco (sin fármaco) con el fin de descartar la actividad de los componentes de las NP. Dichas formulaciones dieron resultado negativo ante la prueba, estableciendo que de existir actividad antituberculosa en la formulación de NP biodegradables cargadas (con fármaco), esta es atribuible totalmente a la CFM incorporada en las mismas. Para este caso, las NP biodegradables cargadas con CFM mostraron una CMI alrededor de los 124 ng/mL. Este valor no sólo es muy cercano con el establecido en la literatura para el fármaco libre (100 ng/mL), sino también ligeramente menor al establecido durante este trabajo (137 ng/mL). Es importante destacar el hecho de que si bien, la nanoformulación no muestra un aumento significativo sobre la actividad antituberculosa propia de la CFM (en comparación con el fármaco libre), dicha actividad previamente establecida, se mantiene a pesar del largo proceso de encapsulación. Procesos fisicoquímicos complejos y variados son necesarios para la elaboración, purificación y posterior aplicación de las NP, por lo que, el conservar la actividad antituberculosa de la CFM es de suma importancia y agrega un valor a la formulación desarrollada en este trabajo. Además, como es de esperarse, el perfil de liberación sostenido *in vitro* que

presentaron las NP-CFM pudo haber influido directamente en la actividad antituberculosa de la formulación, evitando la cristalización del fármaco y permitiendo el contacto constante en función del tiempo entre éste y la bacteria, generando una mayor toxicidad para el microorganismo y por lo tanto, una ligera disminución en la CMI registrada con la CFM libre.

La principal ventaja de una formulación basada en NP cargadas con CFM es que representa un sistema coloidal adecuado para no sólo aumentar la solubilidad del fármaco, que como ya se mencionó, es de naturaleza altamente lipofílica, sino también para permitir su aplicación a partir de una formulación liofilizada, por una vía diferente a la digestiva, por ejemplo, intravenosa o pulmonar, pues los efectos secundarios de la CFM aplicada por vía oral van desde irritación intestinal, diarrea y cólicos, hasta la cristalización del propio fármaco en el epitelio intestinal, los cuales son motivo para el desuso de la CFM en el tratamiento de la TB.

III.5 Conclusiones

Se obtuvo una formulación biodegradable de NP cargadas con CFM con un tamaño de partícula (200 nm) adecuado para su potencial aplicación por vía IV o pulmonar, así como un % EE adecuado (62.50%) a pesar de ser un fármaco altamente hidrofóbico. La caracterización física de las NP-CFM indicó un potencial de superficie de -18.80 mV, lo cual asegura la estabilidad de las NP en un sistema acuoso. El análisis por FT-IR confirma las interacciones químicas entre los componentes de la formulación, pero no muestra la formación de nuevos compuestos. El estudio de liberación *in vitro* de la nanoformulación mostró un proceso paulatino y sostenido que alcanzó la liberación del 73% de la CFM encapsulada hasta por 28 h. Éste perfil posiblemente favoreció el ligero incremento de la actividad antituberculosa de la CFM nanoencapsulada (CMI=124 ng/ml) en comparación con el fármaco libre (CMI=134 ng/ml) al mejorar el contacto y liberación intracelular *in vitro* del activo en presencia de *M. tuberculosis H37Rv*, comprobando, además, que el proceso de nanoencapsulación no afecta la actividad antituberculosa del fármaco. De manera significativa, las NP-CFM liofilizadas recuperan su tamaño original (147 nm) después de almacenarse durante dos años a temperatura ambiente, lo que demostró la gran estabilidad de la nanoformulación liofilizada en función del tiempo. En conjunto, las

características fisicoquímicas, el perfil de liberación sostenido, así como la actividad antituberculosa y la gran estabilidad (NP liofilizadas) mostradas por las NP-CFM sugieren que esta formulación tiene un alto potencial para ser utilizada dentro de un esquema terapéutico para la tuberculosis.

REFERENCIAS

- Ahmad Z, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. 2006. Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(5), 409–416.
- Alshamsan A. 2014. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22(3), 219–222.
- Arbiser JL, Moschella SL. 1995. Clofazimine: a review of its medical uses and mechanisms of action. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32(2 Pt 1), 241–247.
- Bhatia S. 2016. Chapter 2. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In *Natural Polymer Drug Delivery Systems* (pp. 33–93). Springer International Publishing.
- Fahelbom KMS, Timoney RF, Corrigan OI. 1993. Micellar Solubilization of Clofazimine Analogues in Aqueous Solutions of Ionic and Noionic Surfactants. *Pharmaceutical Research*, 10(4), 631–634.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1–R4.
- Fonte P, Reis S, Sarmiento B. 2016. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 225, 75–86.
- Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1–2), 34–52.
- Galindo-Rodriguez SA, Allémann E, Fessi H, Doelker E. 2004. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439.
- Global Alliance for TB Drug Development. (2008). Clofazimine. *Tuberculosis*, 88(2), 96–99.

- Gomez-Flores R, Tucker SD, Kansal R, Tamez-Guerra R, Mehta RT. 1997. Enhancement of antibacterial activity of clofazimine against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex infection induced by IFN-gamma is mediated by TNF-alpha. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39(2), 189–197.
- Gregorova A. 2013. Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry. In *Application of Differential Scanning Calorimetry to the Characterization of Biopolymers, Applications of Calorimetry in a Wide Context* (pp. 3–20). INTECH. Consultado en <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/42247.pdf>
- Hernandez-Valdepeña I, Domurado M, Coudane J, Braud C, Baussard JF, Vert M, Domurado D. 2009. Nanoaggregates of a random amphiphilic polyanion to carry water-insoluble clofazimine in neutral aqueous media. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(2–3), 345–351.
- Hoidy WH, Ahmad MB, Jaffar Al-Mulla EA, Ibrahim NABt. 2010. Preparation and characterization of polylactic acid/polycaprolactone clay nanocomposites. *Journal of Applied Sciences*, 10(2), 97–106.
- Honary S, Zahir F. 2013. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 265–273.
- Huang X, Brazel CS. 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2–3), 121–136.
- Jain Kewal K. 2012. Nanopharmaceuticals. In *The Handbook of Nanomedicine* (Second, pp. 171–223). Springer. Consultado en <http://www.springer.com/in/book/9781603273183>
- Kailasam S, Wise DL, Gangadharam ORJ. 1994. Bioavailability and chemotherapeutic activity of clofazimine against *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice following a single implant of biodegradable polymer. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33, 273–279.
- Kaur IP, Bhandari R, Yakhmi JV. 2014. Lipids as Biological Materials for Nanoparticulate Delivery. In B. Bhushan, D. Luo, S. R. Schricker, W. Sigmund, &

- S. Zauscher (Eds.), *Handbook of Nanomaterials Properties* (pp. 409–455). Springer Berlin Heidelberg.
- Krimm S, Liang CY, Sutherland GBBM. 1956. Infrared spectra of high polymers. V. Polyvinyl alcohol. *Journal of Polymer Science*, 22(101), 227–247.
- Kumar G, Sharma S, Shafiq N, Pandhi P, Khuller GK, Malhotra S. 2011. Pharmacokinetics and tissue distribution studies of orally administered nanoparticles encapsulated ethionamide used as potential drug delivery system in management of multi-drug resistant tuberculosis. *Drug Delivery*, 18(1), 65–73.
- Magnusson B, Ornemark U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (2nd ed.). Consultado en <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>
- Mandal TK, Bostanian LA, Graves RA, Chapman SR, Womack I. 2002. Development of biodegradable microcapsules as carrier for oral controlled delivery of amifostine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(3), 339–344.
- Mehta RT. 1996. Liposome encapsulation of clofazimine reduces toxicity *in vitro* and *in vivo* and improves therapeutic efficacy in the beige mouse model of disseminated *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), 1893–1902.
- Nasiruddin M, Neyaz MK, Das S. 2017. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. *Tuberculosis Research and Treatment*, 2017, e4920209.
- Novartis Pharmaceuticals Corporation. (2006, May). Lamprene - FDA prescribing information, side effects and uses [Divulgación]. Consultado Junio 7, 2017, en <https://www.drugs.com/pro/lamprene.html>
- O'Connor R, O'Sullivan JF, O'Kennedy R. 1995. The pharmacology, metabolism, and chemistry of clofazimine. *Drug Metabolism Reviews*, 27(4), 591–614.
- O'Driscoll CM, Corrigan OI. 1992. Clofazimine. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 21, 75–108.
- Pandey R, Ahmad Z. 2011. Nanomedicine and experimental tuberculosis: facts, flaws, and future. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(3), 259–272.

- Pandey R, Zahoor A, Sharma S, Khuller GK. 2003. Nanoparticles encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis*, 83(6), 373–378.
- Pandey R, Kuller GK. 2004. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(1), 266–268.
- Peters JH, Hamme KJ, Gordon GR. 1982. Determination of clofazimine in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 229(2), 503–508.
- Peters K, Leitzke S, Diederichs K, Borner K, Hahn H, Muller RH, Ehlers S. 2000. Preparation of clofazimine nanosuspension for intravenous used and evaluation of its therapeutic efficacy in murine *Mycobacterium avium* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(1), 77–83.
- Queiroz RHC, Pereira RC, Gotardo MA, Cordeiro DS, Melchior E. 2003. Determination of clofazimine in leprosy patients by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Toxicology*, 27(6), 377–380.
- Reddy VM, Nadadhur G, Daneluzzi D, O’Sullivan JF, Gangadharam PR. 1996. Antituberculosis activities of clofazimine and its new analogs B4154 and B4157. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(3), 633–636.
- Salem II, Steffan G, Düzgünes N. 2003. Efficacy of clofazimine-modified cyclodextrin against *Mycobacterium avium* complex in human macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, 260(1), 105–114.
- Schwinté P, Ramphul M, Darcy R, O’Sullivan JF. 2003. Amphiphilic cyclodextrin complexation of clofazimine. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 47(3–4), 109–112.
- Sharma A, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. 2004. Chemotherapeutic efficacy of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle encapsulated antitubercular drugs at sub-therapeutic dose against experimental tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 599–604.

- Sharma A, Sharma S, Khuller GK. 2004. Lectin-functionalized poly (lactide-*co*-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 761–766.
- Sharma N, Madan P, Lin S. 2016. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 404–416.
- Srikanth CH, Joshi P, Bikkasani AK, Porwal K, Gayen JR. 2014. Bone distribution study of anti leprotic drug clofazimine in rat bone marrow cells by a sensitive reverse phase liquid chromatography method. *Journal of Chromatography B*, 960, 82–86.
- TA Instruments, USA. (2007). TA384 Thermal Analysis Investigation of a Polylactic Acid Biodegradable Plastic. Disponible en: <http://www.tainstruments.com/pdf/literature/TA384%20Thermal%20Analysis%20Investigation%20of%20a%20Polylactic%20Acid%20Biodegradable%20Plastic.pdf>
- Tripathi A, Gupta R, Saraf SA. 2010. PLGA Nanoparticles of anti tubercular drug: Drug loading and release studies of a water. *Internationnal Journal of PharmaTech Research*, 2(3), 2116–2123.
- World Health Organization. (2006). Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. *Weekly Epidemiological Record*, 81(45), 430–432.
- World Health Organization. (2016). *Global Tuberculosis Report 2016*. World Health Organization. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>
- Xie S, Tao Y, Pan Y, Qu W, Cheng G, Huang L, Yuan Z. 2014. Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents. *Journal of Controlled Release*, 187, 101–117.

CAPÍTULO IV:

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFORMULACIONES CON EXTRACTOS DE *Schinus molle* PARA SU APLICACIÓN CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFORMULACIONES CON EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *Schinus molle* PARA SU APLICACIÓN CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*

IV.1 Introducción

La TB es una enfermedad pulmonar causada por *Mycobacterium tuberculosis*, que produce alrededor de 2.5 millones de muertes y 9 millones de casos nuevos al año (World Health Organization, 2016). La OMS ha declarado la presencia de cepas de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes, debido, entre otras cosas, al mal uso y administración de los fármacos antituberculosos convencionales, así como a la larga duración del tratamiento lo que genera desapego por parte de los pacientes (World Health Organization, 2017). En este contexto, la OMS ha establecido estrategias de carácter mundial para el tratamiento y erradicación de la TB, dentro de las que destacan: i) mejora en el esquema de tratamiento, ii) desarrollo de nuevos fármacos, iii) aislamiento e identificación de compuestos químicos a partir de fuentes naturales con potencial antituberculoso, iv) uso de productos etnobotánicos como coadyuvantes en los tratamientos de pacientes y v) diseño y empleo de nuevos sistemas de liberación de activos, entre otras (World Health Organization, 2006).

En años recientes, los extractos naturales obtenidos a partir de plantas han sido sujeto de investigación para el desarrollo de fitofármacos que ayuden al tratamiento de enfermedades de origen bacteriano, tal como la TB (Okunade, Elvin-Lewis, & Lewis, 2004). La diversidad de compuestos que contienen estos extractos y las actividades antimicobacterianas que exhiben en estudios *in vitro* avalan su uso potencial para el tratamiento de la enfermedad (Newton, Lau, & Wright, 2000).

Dentro de los usos medicinales de *Schinus molle* destaca el uso de tizanas como remedio analgésico antibacterial, antifúngico, antiviral, antiespasmódico, astringente, diurético, expectorante, hipotensivo, purgativo, estomáquico, tónico uterino, entre otros (Cabieses, 2013). Se recomienda su uso en padecimientos digestivos (cólicos, bilis, dolor de

estómago y estreñimiento). Los téis de hoja se han utilizado para lavados en enfermedades venéreas (gonorrea). Las vaporizaciones con hoja de pirul han sido utilizadas para tratar resfriados y afecciones bronquiales (asma y bronquitis) (Von Linné, 1753). Además, se ha comprobado que los aceites esenciales obtenidos de *S. molle* tienen significativa actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, tales como: *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremuris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporigenes*, *Acinetobacter calcoacetica*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Brochothrix thermosphacata*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alterdata* (Ibrahim & Al-Naser, 2014; De Mendonça *et al.*, 2012; Luque-Alcaraz *et al.*, 2016). Así también, existe una gran cantidad de estudios que demuestran la gran capacidad bioinsecticida de los aceites esenciales de *S. molle* (López *et al.*, 2014).

Particularmente, extractos hexánicos obtenidos del fruto de *S. molle* han demostrado actividad antituberculosa *in vitro* (contra cepas de *M. tuberculosis H37Rv*) con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 125 µg/ml (Molina-Salinas *et al.*, 2007). Esto muestra el potencial que tienen los extractos de la planta para ser utilizados en el tratamiento de la TB.

Si bien los extractos naturales representan una excelente opción para el tratamiento de la tuberculosis, una de sus grandes limitantes para su aplicación en organismos mayores es su recuperación, ya que, al obtenerse por medio de extracciones con solventes orgánicos, los remanentes pueden desencadenar problemas toxicológicos importantes y/o impedir su aplicación en humanos (Bonifácio *et al.*, 2014). La estabilidad y grado de sensibilidad que presentan los diversos compuestos orgánicos en otros entornos (p.e. intra y extracelular, diferentes pH, presencia de enzimas, entre otros) son otro factor a considerar para su aplicación. Además, muchos de los aspectos farmacocinéticos y efectos citotóxicos de los extractos naturales aún se desconocen por completo lo que impide su uso directo (Al-Jaber & Khater, 2014). Para impedir lo anterior, recientemente, se ha estudiado la aplicación de los extractos naturales en sistemas de liberación nanopartículados, los cuales podrían disminuir los efectos tóxicos de los fitofármacos y otorgar un mejor biodireccionamiento de los compuestos. Así, las nanopartículas poliméricas (NP), proporcionan una novedosa

manera de formular y aplicar los extractos naturales (Armendáriz-Barragán *et al.*, 2016; Zorzi, Carvalho, Von Poser, & Teixeira, 2015).

Las NP son sistemas coloidales, con tamaños de 1 a 500 nm, elaborados a partir de polímeros preformados naturales o sintéticos, en los cuales los principios activos pueden estar encapsulados, inmersos, adheridos o adsorbidos en la matriz polimérica. Entre otras cosas, estos acarreadores otorgan protección a los compuestos activos, biodireccinamiento a tejidos o células blanco, liberación prolongada de los activos, disminución en el número de dosis aplicadas y, por lo tanto, aumento de eficiencia en el tratamiento de las enfermedades (Mishra, Patel, & Tiwari, 2010).

Considerando todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar nanoformulaciones a base de polímeros sintéticos y el extracto metanólico obtenido a partir de la hoja del árbol *S. molle* (pirul). Tres polímeros fueron seleccionados para el desarrollo de dos formulaciones biodegradables para aplicación intravenosa con ácido poliláctico (PLA) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y una formulación para aplicación oral con Eudragit L100-55 (EL100-55). Una vez obtenidas, las formulaciones fueron caracterizadas fisicoquímicamente y se estudió la actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis* para evaluar su uso potencial como agente coadyuvante en el tratamiento de la TB.

IV.2 Materiales:

Metanol (MET, Grado CLAR, Tedia®), acetonitrilo (ACN, Grado CLAR, JT Baker®) ácido poliláctico (Sigma-Aldrich®), ácido poli(láctico-co-glicólico) (Sigma-Aldrich®), Eudragit L 100-55 (HELM de México), ácido fórmico (AF, Grado CLAR, Merck Millipore®), acetona (Grado reactivo, CTR Scientific), alcohol polivinílico (PVA), agua destilada y agua milli-Q.

IV.3 Metodología

Recolección del material vegetal: La hoja de *S. molle* se recolectó en la localidad de Arteaga, Coahuila, México durante octubre del 2013. Una vez separada del tallo, la hoja se dejó secar a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

Obtención y caracterización fisicoquímica del extracto metanólico de hoja de S. molle:

Para la obtención de extracto metanólico de la hoja (HMM) de *S. molle* se utilizó la técnica de maceración. El extracto seco se conservó en un frasco ámbar bajo refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Para pre-identificar los metabolitos presentes en el extracto HMM, se realizaron las siguientes pruebas fitoquímicas cualitativas: KMNO₄ (presencia de insaturaciones), dinitrofenilhidracilo (presencia de grupos carbónilo), bicarbonato de sodio (presencia de grupos carboxilo), cloruro férrico (grupos OH-fenólicos), Libermann-Burchard (presencia de esteroides/triterpenoides), NaOH al 1% (presencia de cumarinas), Dragendorf (presencia de alcaloides), Baljet (presencia de sesquiterpenlactonas), quinonas, Shinoda (presencia de flavonoides) y antronas (presencia de carbohidratos). El resultado final se expresó como presencia o ausencia del compuesto.

Como parte de la caracterización del extracto HMM se realizaron pruebas de solubilidad de éste en diversos solventes (metanol, etanol, isopropanol, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo y DMSO). Las pruebas fueron de utilidad para la posterior encapsulación del extracto. Los resultados fueron expresados de manera cualitativa en base al grado de solubilidad con cruces.

Nanoencapsulación del extracto metanólico de S. molle: Para encapsular el extracto HMM de *S. molle* en NP se utilizó la técnica de nanoprecipitación descrita por Fessi (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury & Benita, 1989). Brevemente, se elaboró una fase orgánica con acetona, HMM y polímero, según el caso (PLA, PLGA ó EL 100-55). La fase orgánica fue inyectada en 20 ml de PVA al 1% (p/p) (fase acuosa), lo que desencadena un proceso de difusión del solvente y, por consiguiente, la agregación del polímero, induciendo la formación de las NP con el extracto incorporado. La suspensión obtenida fue sometida a evaporación con presión reducida (Rotavapor Modelo RE301, Marca Yamato) para la eliminación del solvente. Para la elaboración de las NP blanco (sin extracto) se siguió la metodología señalada, sin agregar el HMM en la fase orgánica.

Para determinar el tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) se realizó un análisis de la muestra por dispersión dinámica de luz (Nano Zetasizer Z90, Malvern). Brevemente, para la medida de tamaño y PDI, una muestra de 50 µl de NP fue diluída en

2.5 ml de agua destilada y se colocó en la celda de lectura (por triplicado). Para la medida del potencial zeta de las NP, 50 μ l de NP fueron diluídos en 2.5 ml de NaCl (0.1 mM, pH fijo) y se colocaron en la celda de lectura (por triplicado).

Purificación y conservación de las NP blanco y cargadas: Una vez evaporadas, las NP fueron sometidas a centrifugación (Allegra TM 64R Centrifuge, Beckman Coulter). La pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada y se congeló. Posteriormente, para su conservación, las NP se liofilizaron (Liofilizadora LABCONCO Freezone 2.5).

Obtención del perfil cromatográfico por CLAR del HMM y cuantificación en las nanopartículas poliméricas: Como estrategia para dar seguimiento al HMM incorporado en las NP, inicialmente, se desarrolló un método cromatográfico para la obtención del perfil del HMM por CLAR. Brevemente, se preparó una solución de HMM a concentración conocida, la cual fue inyectada en un CLAR con detector UV de arreglo de diodos (Bomba Varian 9012, Autosampler ProStar Varian 410 y Detector Polychrom Varian 9065) y una columna Zorbax (Eclipse Plus, C18, Marca Agilent). Una vez obtenido el perfil cromatográfico del extracto se seleccionaron los tiempos de retención (TR) correspondientes a los picos con mayor área bajo la curva (ABC, mAu/sg) a una λ =220 nm.

En base ABC de los picos con TR de 28, 38 y 39 min, se preparó una curva de calibración del extracto HMM para cada uno de los picos, en un rango de 3-25 mg/ml (Figura IV.1). La ecuación de la recta y el coeficiente de correlación para cada uno de los picos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla IV.1. Análisis de regresión lineal para las curvas de calibración de HMM elaboradas por CLAR para los picos con TR de 28, 38 y 39 min.

TR de Pico (min)	Ecuación de la Recta	Coefficiente de Correlación (r^2)
28	$y = 169.21x + 326.74$	0.96
38	$y = 196.25x + 272.90$	0.94
39	$y = 489.30x + 571.83$	0.97

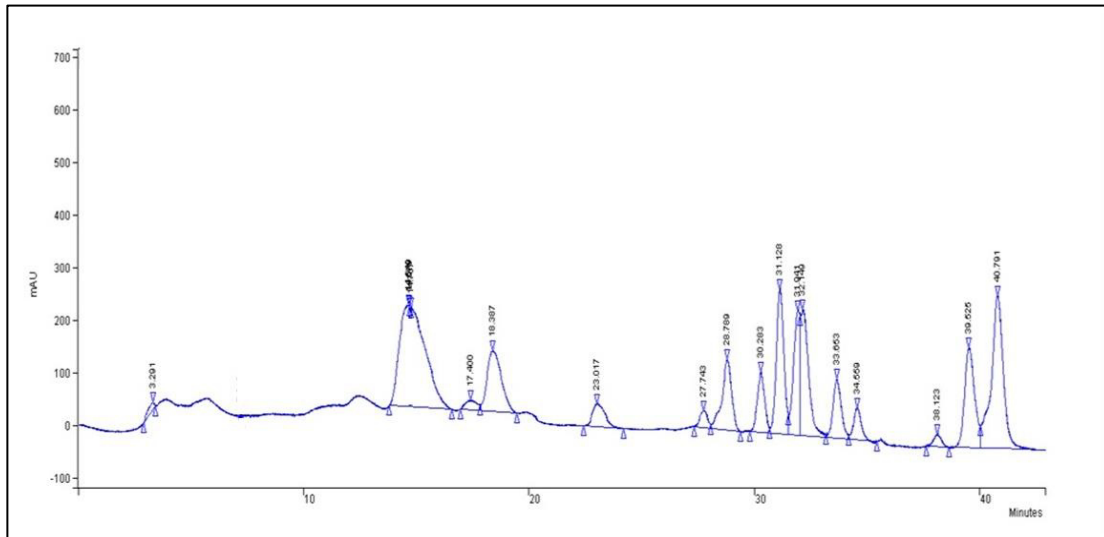


Figura IV.1. Perfil cromatográfico obtenido por CLAR para el extracto crudo HMM de *Schinus molle*.

Una vez que se establecieron las curvas de calibración se determinaron los parámetros de encapsulación del extracto HMM incorporado en las NP. Para lo anterior, una cantidad conocida de NP cargadas se disolvieron en una mezcla de solventes. Cada muestra se se inyectó en el cromatógrafo con el método antes descrito. Una vez obtenido el perfil de las NP cargadas, se determinó el ABC para el pico con TR de 39 min y se estableció el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE), con la fórmula matemática siguiente:

$$\% EE = \frac{(\text{mg})\text{Extracto HMM en lote completo de NP}}{(\text{mg}) \text{ Extracto HMM en FO}} \times 100$$

Análisis morfológico de las NP blanco y cargadas con extracto HMM: El análisis morfológico de las NP blanco y cargadas se realizó por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). A partir de lotes purificados, se realizaron diluciones de las NPS. Posteriormente, se colocó una gota de la suspensión sobre un portaobjetos metálico.

Análisis por Espectroscopía de IR con transformada de Furier (IR-FT) del extracto HMM y las NP cargadas: El FT-IR de las formulaciones obtenidas se analizó con la finalidad de establecer algún tipo de interacción entre los componentes de las NP. Distintas muestras liofilizadas fueron colocadas en el porta muestras. Los espectros optimizados de los tres polímeros empleados, tensoactivo (PVA), NP blanco y NP cargadas con extracto HMM fueron obtenidos en un rango de 400-4000 cm^{-1} y con 1 cm^{-1} de resolución en un FT-IR-Espectro (FT-IR Spectrofotometer FRONTIER, Perkin-Elmer).

Actividad antituberculosa del extracto HMM libre y nanoencapsulado: Para conocer la actividad antituberculosa del extracto libre y nanoencapsulado se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de Azul de Alamar en Microplaca (AMBA). Inicialmente, una alícuota de *M. tuberculosis H37Rv* (ATCC 27294) se dispuso en caldo de cultivo Middlebrook 7H9 (Beckton-Dickinson) durante dos semanas. Para determinar la CMI del extracto libre, se preparó una solución de HMM en DMSO (800 $\mu\text{g/ml}$). Además, se elaboraron las NP blanco y NP con HMM, las cuales se esterilizaron por filtración (Steriflip, 0.22 μm , Membrana PVDF, Millipore®).

El día del ensayo, a partir del cultivo previo de *M. tuberculosis* se prepararon 20 ml de suspensión bacteriana ajustados a 0.5 en la escala de Mc Farland en el caldo de crecimiento. A la par, en una placa de 96 pocillos se colocaron 200 μl de agua estéril en los pocillos de la periferia y 100 μl de caldo Middlebrook 7H9 en los pocillos de prueba. Después, se agregaron 100 μl de la solución de HMM libre o de la suspensión de las NP previamente esterilizada en el primer pocillo de prueba. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas a lo ancho de la placa. Finalmente, se agregaron 100 μl de la suspensión bacteriana preparada. Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días y posteriormente, se les agregó 20 μl de colorante de azul de alamar y 12 μl de Tween 80 al 10 % (v/v) en los pocillos de prueba. Las placas se reincubaron a 37 °C durante 24 h. Después de esta incubación se buscó el cambio de color en el colorante de azul a rosa. Finalmente, se determinó la CMI para cada una de las formulaciones.

Determinación de la citotoxicidad in vitro del extracto HMM libre y nanoencapsulado: Para determinar la toxicidad se correlacionó la hemólisis inducida por el extracto HMM,

las NP blanco o las NP cargadas sobre una muestra de eritrocitos humanos (RBC, por sus siglas en inglés). Brevemente, a partir de una solución de HMM, de una suspensión de NP blanco o de NP cargadas, se prepararon los sistemas (por triplicado) de prueba a seis concentraciones diferentes (10-150 ppm) en presencia de RBC. Así mismo, se preparó un blanco de hemólisis positiva (con agua destilada) y de hemólisis negativa (con PBS). Una vez elaborados los sistemas de prueba, se dejaron en incubación con agitación constante (Modelo Vortemp 56, Marca Labnet). Después de la incubación, los sistemas se sometieron a centrifugación (Force Micro 1624, Marca Select BioProducts) y a partir del sobrenadante se determinó la absorbancia de cada muestra por espectrofotometría UV-VIS (Lector de microplacas Modelo Epoch, Marca Biotek). Mediante la siguiente fórmula se determinó el porcentaje de hemólisis eritrocitaria en cada muestra, lo cual se consideró directamente proporcional a la citotoxicidad del extracto o las NP:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(ABS_{Mta} - ABS_0)}{(ABS_C - ABS_0)} \times 100$$

Dónde:

ABS_{mtra} : Absorbancia de la muestra problema.

ABS_0 : Absorbancia del PBS.

ABS_C : Absorbancia del control positivo (agua destilada).

Determinación de citotoxicidad del extracto y NP cargadas por ensayo con Artemia salina. Como prueba adicional para establecer el perfil preliminar toxicológico tanto del extracto HMM como las NP cargadas se utilizó el bioensayo con *Artemia salina*. Brevemente, se prepararon soluciones del extracto libre y suspensiones de las NP cargadas en una concentración de 10 a 1,000 ppm en agua salina. A la par, una cantidad de quistes de *A. salina* fueron puestos a eclosionar, bajo condiciones de aereación, a 25 ± 4 °C en una cámara de vidrio. Transcurrido el tiempo de incubación (24-48 h), los nauplios eclosionados fueron recolectados y se colocaron en una caja de poliestireno de 24 pozos (20 nauplios por pocillo de prueba). A partir de las preparaciones elaboradas con el HMM y las NP se tomó una alícuota y se colocó en el pocillo de prueba correspondiente, para posteriormente, dejarse bajo incubación durante 24 h (25 ± 4 °C). Finalmente, después de

la incubación, se realizó un conteo de los nauplios vivos y muertos para determinar la LC_{50} por medio de un análisis estadístico PROBIT tanto para el extracto libre como encapsulado.

Pruebas de liberación in vitro del HMM incorporado en las nanopartículas poliméricas.

Para obtener el perfil de liberación *in vitro* de las NP cargadas con HMM; inicialmente, se pesó una cantidad de NP cargadas y se resuspendió en el medio de liberación (Tween para las NP de PLA y PLGA o agua destilada pH ácido para las NP de EL 100-55). El lote resuspendido se dividió en 10 muestras independientes, las cuales se incubaron a 37 °C y se mantuvieron bajo agitación ligera constante. El estudio de liberación se llevó a cabo durante 28 h, tomando muestras a tiempos previamente establecidos. Las muestras se centrifugaron y a partir del sobrenadante se llevó a cabo la cuantificación del fármaco liberado con el método por CLAR previamente desarrollado.

IV.4 Resultados y Discusión

Obtención del extracto y caracterización fitoquímica: El extracto metanólico de hoja de *S. molle* se obtuvo por medio de la técnica de maceración. Dicha técnica permite obtener un buen rendimiento de extracto y, además, disminuye el riesgo de que los compuestos contenidos en el extracto sean afectados en sus propiedades fisicoquímicas (degradación) o su actividad biológica (inhibición de propiedades biológicas), ya que no se requiere aplicar calor. Además, es una técnica sencilla y de bajo costo, que permite utilizar diversos solventes y así, obtener una gama amplia de extractos naturales a partir de plantas (Nn. Azwanida, 2015). El porcentaje de rendimiento obtenido para el extracto HMM fue de 12.7%.

Como parte de la caracterización fisicoquímica del extracto se elaboraron pruebas de preidentificación de las familias de compuestos químicos presentes en el extracto HMM. La Tabla IV.2 contiene los resultados para las pruebas fitoquímicas realizadas, las cuales, mostraron ser positivas para la presencia de compuestos con insaturaciones, grupos fenólicos y flavonoides. Dentro de los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas se encuentran los polifenoles. Químicamente, son compuestos que presentan uno o varios grupos fenólicos en su estructura (Martins, Barros & Ferreira, 2016). Dentro del amplio espectro de actividades biológicas atribuibles a los polifenoles se encuentran la

antioxidante, antiinflamatoria, antibacterial y antiviral (Li *et al.*, 2014). Particularmente, dentro de este grupo se encuentran los flavonoides, compuestos que han mostrado actividad antimicrobiana, entre otras (Odeh *et al.*, 2014). Considerando el resultado positivo de estas pruebas en el extracto HMM, se supuso que la actividad antibacteriana, particularmente, antituberculosa, podría estar presente en el extracto.

Tabla IV.2. Evaluación cualitativa y de preidentificación fitoquímica por pruebas colorimétricas del extracto HMM.

Prueba Fitoquímica	Resultado
KMnO ₄ (Insaturaciones)	Positivo
Dinitrofenilhidracilo (Grupo Carbonilo)	Negativo
Bicarbonato de Sodio (Grupo Carboxilo)	Negativo
Cloruro Férrico (Grupo OH Fenólico)	Positivo
Liebermann-Burchard (Esteroles/Terpenos)	Negativo
NaOH al 10% (Cumarinas)	Negativo
Dragendorff (Alcaloides)	Negativo
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	Negativo
Quinonas	Negativo
Saponinas	Negativo
Shinoda (Flavonoides)	Positivo
Antronas (Carbohidratos)	Negativo

En cuanto a los ensayos de preformulación del extracto HMM, la Tabla IV.3 muestra los resultados para las pruebas de solubilidad. El extracto fue soluble en metanol, etanol y acetona. Las pruebas de solubilidad permiten establecer y desarrollar otros procesos con los activos de interés (p.e. encapsulación, pruebas de actividad biológica, pruebas toxicológicas, entre otras).

Tabla IV.3. Pruebas de solubilidad del extracto HMM en solventes parcialmente miscibles en agua.

Solvente	Resultado
Metanol	+++
Etanol	++
Isopropil	++
Acetona	+++

(-) Insoluble, (+) Poco soluble, (++) Soluble, (+++) Muy soluble

1 ml de solvente

Nanoencapsulación del extracto metanólico de *Schinus molle*: Para la elaboración de las NP se utilizó la técnica de nanoprecipitación. Dentro de los estudios de preformulación es importante conocer la influencia de los diversos factores implicados en la elaboración de las NP. Previamente, se había establecido como tamaño ideal NP con un tamaño alrededor de los 200 nm. Se ha documentado que éste tamaño de partícula presenta una mayor interacción con substratos biológicos, tales como bacterias, tejidos (p.e. piel, gastroentérico, pulmonar, entre otros) y células sanguíneas (Shang, Nienhaus & Nienhaus, 2014). Además, éste tamaño permite la fagocitación de las partículas por parte de los macrófagos, los cuales funcionan como reservorios del bacilo tuberculoso durante el desarrollo de la tuberculosis pulmonar. Por lo que, es probable que esta característica de las NP pueda influir en un aumento de la efectividad de la nanoformulación desarrollada contra *M. tuberculosis* (Mailänder & Landfester, 2009). Así, con el objetivo de determinar

la cantidad de polímero necesaria para el desarrollo de la formulación con tamaño ideal, se realizó un estudio de la relación de la cantidad de polímero (10-70 mg) presente en la fase orgánica sobre el tamaño de partícula. La Figura IV.2 muestra los resultados del estudio. De manera general, se observó una relación directamente proporcional entre la cantidad de polímero utilizada y el tamaño de partícula, siendo las formulaciones elaboradas con PLA y EL100-55 las que presentaron mayor y menor tamaño, respectivamente.

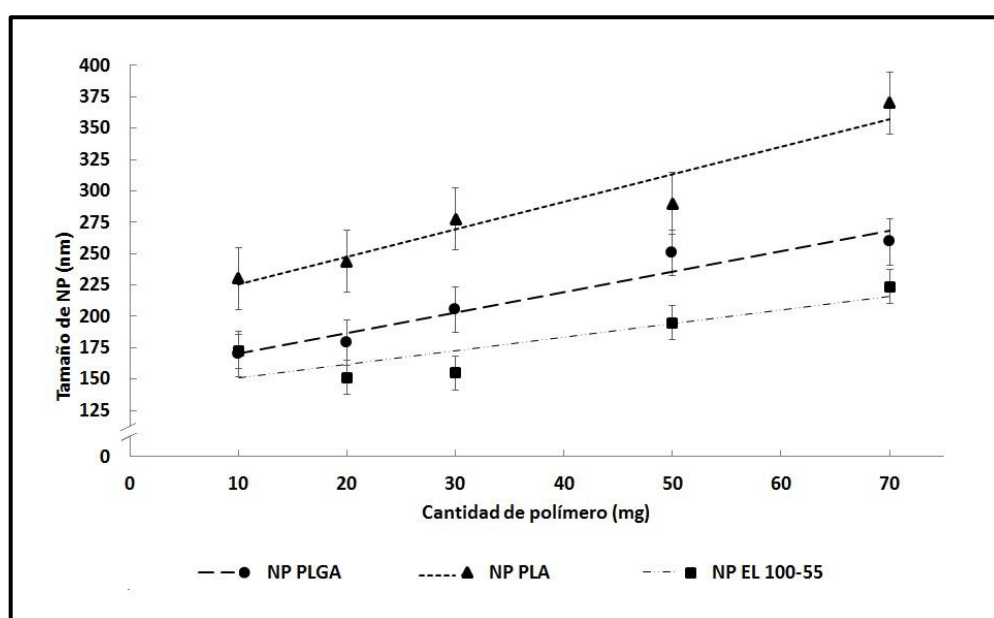


Figura IV.2. Influencia de la cantidad de polímero presente en la fase orgánica sobre el tamaño de nanopartícula (n=3, $\bar{x} \pm DS$).

Particularmente, NP con un tamaño de entre 230 y 370 nm se presentaron cuando se utilizó PLA como polímero formador. En el caso de las NP de PLGA el rango de tamaño obtenido fue de entre 170 a 260 nm y, finalmente, para las NP elaboradas con EL 100-55 se obtuvo un tamaño de 175 a 225 nm en un rango de 10 a 70 mg de polímero, respectivamente. Todas las formulaciones mostraron un PDI inferior a 0.2 lo que garantizó la homogeneidad poblacional de las partículas en las preparaciones. Los resultados coinciden con tendencias obtenidas en otras formulaciones elaboradas con los mismos polímeros (Clemens *et al.*, 2012; Lim, Tiemann, Hunstad, Elsabahy, & Wooley, 2016). Al aumentar la cantidad de

polímero en la fase orgánica, una mayor cantidad de cadenas están disponibles para su posterior agregación durante el proceso de difusión del solvente, que se da lugar en la inyección de la fase orgánica en la fase acuosa, resultando en NP de mayor tamaño (Nasiruddin, Neyaz, & Das, 2017). Además, sin importar el polímero que se utilice, una mayor cantidad de polímero disuelto por unidad de solvente, genera el aumento en la viscosidad de la fase orgánica, lo que influye directamente sobre la inyección de ésta en la fase acuosa, generando una difusión de solvente con mayor o menor velocidad si la concentración de polímero es baja o alta, respectivamente, resultando en un mayor tamaño de partícula cuando la fase es más viscosa (con mayor cantidad de polímero presente) (Figura IV.2).

Otro parámetro que puede influir sobre el tamaño de la NP formada es la composición química del polímero, ya que está directamente relacionado con las interacciones químicas que éste pueda o no establecer ya sea entre sus cadenas (afectando el plegamiento del polímero) o el grado de solubilidad que presente el polímero en solución (formación de agregados durante nanoprecipitación). Especialmente, los grupos terminales presentes en los polímeros utilizados en este trabajo son éster, ácido (COOH) y metacrilato para el PLA, PLGA y EL100-55, respectivamente. Para el caso de los polímeros biodegradables, la solubilidad limitada que pudo presentar la cadena polimérica de PLA (presencia del grupo terminal éster) en comparación con la de la cadena con grupo ácido terminal del PLGA debido a la interacción con la acetona (solvente de la fase orgánica) y el agua de la fase acuosa pudo influir en el aumento de tamaño que se obtuvo cuando se utilizó PLA como polímero formador de las NP. Para el caso del polímero metacrilato EL10055 las diferentes interacciones químicas que presenta tanto con la fase orgánica como la acuosa, aunado a las interacciones solvente-agua propias de la acetona pudieron haber influido en el rango de tamaño obtenido para las NP, las cuales fueron más pequeñas que las obtenidas con los polímeros biodegradables (Schubert, Delaney, & Schubert, 2011; Song *et al.*, 2006). En un estudio elaborado por Galindo-Rodríguez y col. se demostró que la acetona, al tener un valor bajo del parámetro de solubilidad solvente-agua, permitía la obtención de NP en un rango de tamaño entre los 100-200 nm, sin formación de agregados, lo cual era un rango muy estrecho en comparación a los obtenidos con otros solventes (p.e. etanol, dimetilsulfoxido o alcohol isopropílico). Dichos resultados concuerdan con los obtenidos

en éste trabajo y puede explicar el fenómeno que generó la obtención de NP de menor tamaño con el EL10055 en comparación con las formulaciones de PLA y PLGA (Galindo-Rodriguez, Allémann, Fessi, & Doelker, 2004). Así, se seleccionaron como adecuadas las formulaciones con 10, 20 y 50 mg de PLA, PLGA y EL10055 en la fase orgánica, respectivamente, para preparar las NP. Finalmente, una vez que fue posible la obtención de NP con un tamaño alrededor de los 200 nm y sin presencia de agregados poliméricos en el lote final, se continuó con la incorporación del extracto HMM en las formulaciones.

En otra caracterización de las NP, la Tabla IV.4 muestra los valores de potencial zeta (ζ) obtenidos para cada formulación, los cuales fueron negativos, indicando que las NP en suspensión presentan cierta estabilidad, conservando las propiedades físicas propias de un sistema coloidal e impidiendo la formación de agregados de partículas en función del tiempo.

Tabla IV.4. Caracterización fisicoquímica de las nanoformulaciones con extracto HMM.

Formulación	Tamaño de NP (nm) *	Índice de Polidispersidad (PDI) *	Potencial Zeta (ζ) (mV) *	Eficiencia de Encapsulación (%) **
PLA-HMM	230.13 \pm 20.3	0.106 \pm 0.025	-16.35 \pm 1.77	32.99 \pm 15.88
PLGA-HMM	179.20 \pm 5.40	0.199 \pm 0.023	-14.70 \pm 0.14	34.40 \pm 18.08
EL10055-HMM	195.00 \pm 15.80	0.173 \pm 0.023	-21.20 \pm 0.023	44.32 \pm 20.80

* (n=3, $\bar{x} \pm DS$)

** (n=5, $\bar{x} \pm DS$)

Obtención del perfil cromatográfico por CLAR del HMM y cuantificación en NP: Como parte de la caracterización química del extracto HMM se estableció un método cromatográfico para la obtención del perfil de compuestos presentes en el extracto HMM para posteriormente, cuantificar el extracto HMM incorporado en las formulaciones. Convencionalmente, el seguimiento de los perfiles cromatográficos desarrollados por CLAR, puede realizarse en base a la identificación de compuestos huella presentes en el extracto (Augusti Boligon & Linde Athayde, 2014), sin embargo, en muchas ocasiones debido a la complejidad química de los extractos y la necesidad de utilizar técnicas de

identificación química más complejas y costosas (p.e. espectroscopía de masas) es difícil establecer éste tipo de estrategias. Así, en este trabajo se estableció una metodología nueva y diferente. En la Figura IV.1 se muestra el perfil del extracto HMM obtenido por CLAR, dónde, de manera general, se pudieron observar 16 señales que se atribuyeron a 16 compuestos presentes en el extracto crudo. Posteriormente, en base al ABC que presentaban las diversas señales, se seleccionaron tres picos, con TR de 28, 38 y 39 min, los cuales se consideraron como los compuestos mayoritarios (por presentar la mayor ABC). Después, se realizó una curva de calibración en un rango de concentración de 3-20 mg/ml de extracto y se realizó un análisis de regresión lineal de los datos obtenidos para establecer la ecuación de la recta ($y=mx+b$) y el coeficiente de correlación (R^2). De las tres ecuaciones de la recta obtenidas, la correspondiente al pico con TR de 39 min fue la que presentó una mayor correlación entre los datos analizados (Tabla VI.1), con un $R^2=0.97$. A pesar de ser un coeficiente de correlación con valor por debajo de 0.99, el valor es aceptable, pues, como se mencionó con anterioridad, los extractos naturales son matrices muy complejas, dónde la cantidad y composición de los compuestos químicos pueden presentar alta variabilidad, aún entre muestras tomadas a partir del mismo extracto. Este valor indicó que la curva de calibración obtenida con la señal del pico con TR de 39 min era adecuada para poder establecer los porcentajes de encapsulación para cada una de las formulaciones y finalmente, la dosificación de las NP en la determinación de la CMI sobre *M. tuberculosis*.

Una vez que se estableció el método de cuantificación de las NP por CLAR, se establecieron los porcentajes de encapsulación para las formulaciones de interés. La Tabla IV.4 muestra los valores de % EE obtenidos para la formulación de PLA-HMM, PLGA-HMM y EL10055-HMM. De manera general, la formulación elaborada con EL10055 mostró un mayor % EE (44.32%) en comparación con las formulaciones elaboradas a partir de los polímeros biodegradables. Por su parte, las formulaciones de PLA-HMM y PLGA-HMM mostraron porcentajes similares entre ellas (32.99 ± 15.88 y $34.40 \pm 18.08\%$, respectivamente). Éstos % EE no son tan altos como los registrados para otras formulaciones elaboradas a partir de extractos naturales (Jia, Barwal, Thakur, & Yadav, 2015; Pereira *et al.*, 2015; Renuka, 2013). Sin embargo, es de esperarse que la incorporación de un producto natural tan complejo como un extracto crudo sea un proceso

más difícil y represente un reto mayor en comparación con un activo único (p.e. fármaco o compuesto aislado), por lo que, de primer inicio, estos porcentajes de encapsulación se consideraron adecuados para continuar con la evaluación y caracterización de las NP.

La diferencia en la incorporación del extracto HMM entre las diversas formulaciones puede atribuirse a dos aspectos importantes: i) los relacionados con las características químicas de los elementos implicados en la formulación y ii) los relacionados con las características físicas de la formulación como tal. Considerando el primer aspecto, la incorporación de activos en las NP depende, principalmente, de las interacciones o afinidad entre los grupos funcionales de los polímeros y los grupos funcionales propios de los compuestos químicos presentes en los activos encapsulados (p.e. extractos, aceites esenciales, fármacos). Así, probablemente, en la formulación elaborada con el polímero EL10055, la presencia de los grupos metacrilato terminales pudieron presentar una mayor afinidad por las moléculas presentes en el extracto HMM, reflejando ser la formulación con una mayor incorporación de activo. Para el caso de las NP elaboradas con PLA tanto la presencia de los grupos éster terminales, como la hidrofobicidad propia del monómero D,L-láctico pueden explicar la incorporación selectiva de distintos tipos de moléculas (Tokiwa & Calabia, 2006). Un fenómeno similar puede presentarse en las formulaciones elaboradas con PLGA, el cual es un co-polímero formado por unidades de ácido láctico y ácido glicólico. Las interacciones químicas que éste polímero puede establecer con otros compuestos está directamente vinculada a la relación en que los monómeros están presentes dentro de la macromolécula (en éste caso 50:50), siendo la unidad de ácido glicólico la que determina la hidrofiliidad global del polímero (Makadia & Siegel, 2011). Además, la presencia de grupos ácidos terminales también se relaciona con éste aspecto. Considerando lo anterior, es posible que tanto los grupos terminales presentes, así como el grado de hidrofobicidad/hidrofiliidad del PLA y PLGA, influyeran directamente sobre la cantidad (porcentaje de encapsulación) y el tipo de moléculas (hidrofílicas o hidrofóbicas) del extracto que fueron incorporadas, reflejando porcentajes de encapsulación menores que el obtenido con el polímero EL10055, pero no obstante siendo similares entre ellas (Tabla IV.4).

En cuanto al segundo aspecto, las propiedades físicas de la formulación, la diferencia de la incorporación del extracto en las NP pudo deberse a que la cantidad inicial de polímero utilizada en cada formulación fue diferente, siendo de 10, 20 y 50 mg para el PLA, PLGA y EL10055, respectivamente (Figura IV.3). Generalmente, una mayor cantidad de polímero en la fase orgánica propicia dos fenómenos que pueden incrementar la incorporación del activo. Por una parte, al incrementar la cantidad de polímero aumenta el número de cadenas poliméricas disponibles para interactuar químicamente con una mayor cantidad de moléculas del principio activo a incorporar, reflejándose en una mayor incorporación del mismo en el sistema. Adicionalmente, el incremento de polímero genera NP más grandes, las cuales, eventualmente, tienen un espacio físico más grande dónde un mayor número de moléculas de activo pueden acomodarse, generando a su vez, una mayor incorporación del activo.

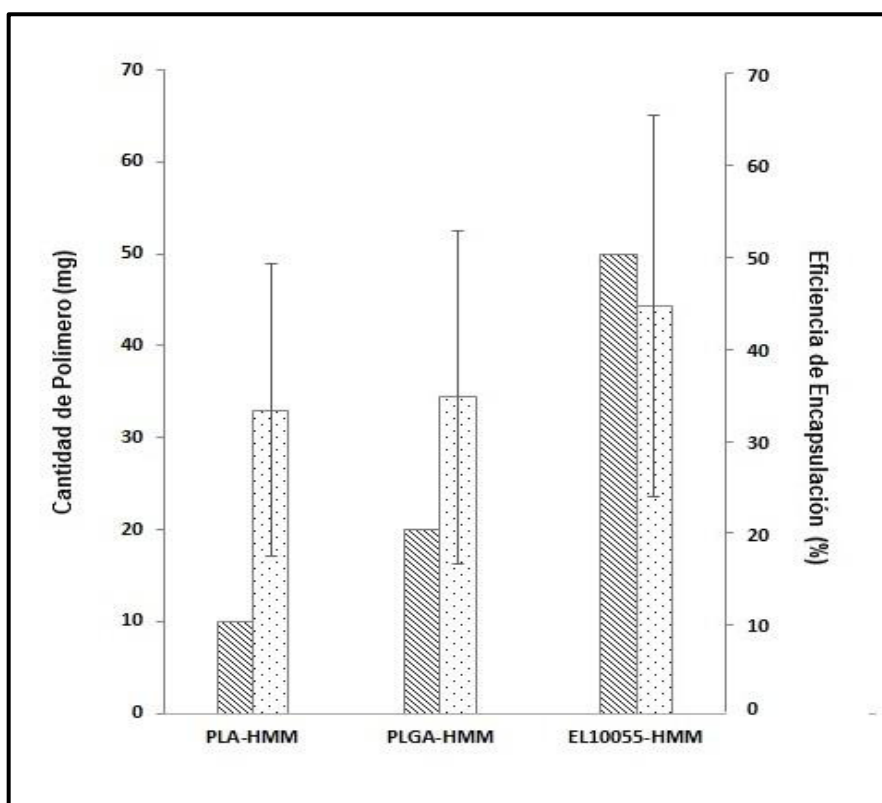


Figura IV.3. Comparación entre formulaciones en base a la cantidad de polímero utilizada en la fase orgánica y la eficiencia de encapsulación del extracto HMM (n=5, $\bar{x} \pm DS$).

Análisis morfológico de las nanopartículas poliméricas blanco y con extracto HMM: El análisis morfológico de la formulación de PLGA (para esquematizar la morfología de las partículas biodegradables) y EL 100-55 fueron observadas por MET. La Figura IV.4 muestra la microscopía para las NP blanco (A) y de PLGA-HMM (B) dónde se observan partículas de forma esférica; el tamaño y distribución poblacional de partícula coincide con el registrado para esta formulación con anterioridad por DLS (Nano zetasizer Z90). En el caso de la formulación elaborada con EL 100-55 (Figura IV.4-C y IV.4-D) se muestran partículas con características físicas similares (forma esférica, superficie lisa, tamaño e índice similar al registrado anteriormente).

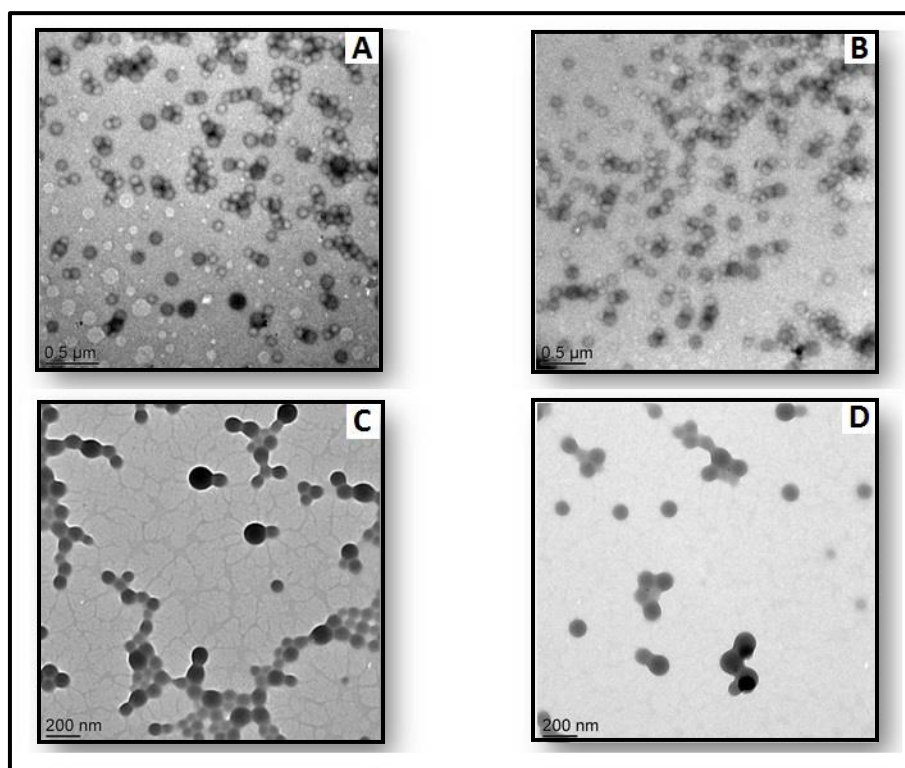


Figura IV.4. Microscopía Electrónica de Barrido de las nanoformulaciones. A) NP PLGA blanco, B) NP PLGA cargadas, C) NP EL10055 blanco y D) NP EL10055 cargadas.

Análisis térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido de las nanoformulaciones: El extracto natural HMM presenta tres picos endotérmicos (Figuras. IV.5-C y IV.6-C) a 103, 118 y 140 °C, siendo éste último de mayor anchura y entalpía (224.3 J/g), lo cual se puede atribuir a la amplia mezcla de compuestos presentes en el extracto crudo, tal y como reportan perfiles calorimétricos para otros extractos naturales (Anbinder, Deladino,

Navarro, Amalvy, & Martino, 2011). Respecto a las NP elaboradas con PLGA, tanto el polímero como las NP blanco y cargadas muestran un pico endotérmico característico a 38 °C (Figuras. IV.5-D y IV.5-E), el cual indica la transición vítrea para el polímero presente (Swarnali Islam, 2011). Por su parte, las NP cargadas con el extracto HMM muestran una endoterma de poca intensidad alrededor de los 175 °C, esto puede deberse a que los compuestos se encuentran en forma amorfa dentro de las NPS (Mandal, Bostanian, Graves, Chapman, & Womack, 2002).

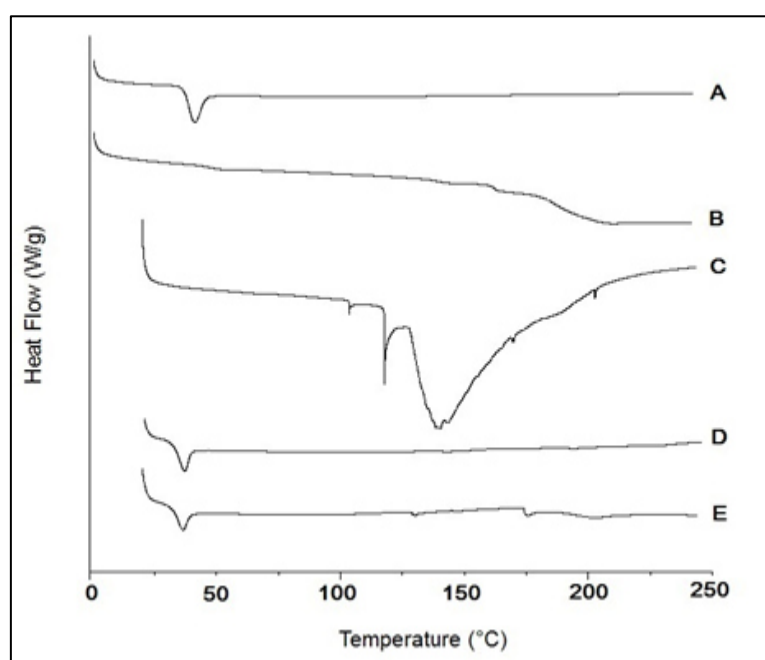


Figura IV.5. Calorimetría Diferencial de Barrido para las nanoformulaciones elaboradas con PLGA. A) PLGA, B) PVA, C) Extracto HMM, D) NP PLGA blanco y E) NP PLGA cargadas con HMM.

Por su parte, las NP de EL 100-55 blanco y cargadas con HMM muestran un pico endotérmico característico (Figuras IV.6-C y IV.6-D) alrededor de los 150 °C, el cual aparece también en el perfil del polímero (Figura IV.6-B), éste puede ser atribuido a la transición vítrea del polímero (Parikh, Gupta, Meena, & Serajuddin, 2014). Cuando el extracto está presente en las NP (Figura IV.6-E) un pico endotérmico agudo aparece a los 219 °C. Esta señal desplazada puede atribuirse a la presencia del extracto HMM encapsulado (o grupo de compuestos). Tanto el desplazamiento como la intensidad de éste

endoterma pueden atribuirse a que el extracto o compuestos presentes se encuentran en estado cristalino dentro del sistema nanopartículado.

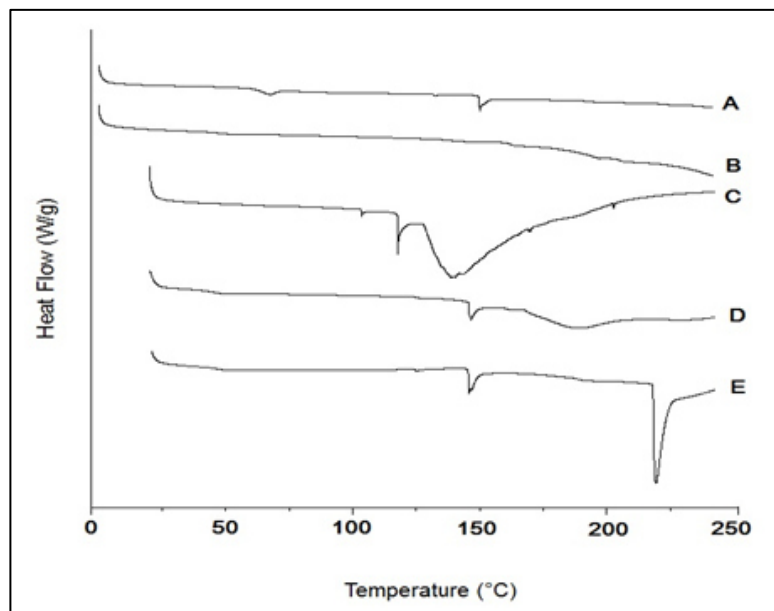


Figura IV.6. Calorimetría Diferencial de Barrido para las nanoformulaciones con EL10055. A) EL10055, B) PVA, C) Extracto HMM, D) NP EL10055 blanco, E) NP EL10055 cargadas con HMM.

Análisis por Espectroscopía de IR con transformada de Fourier (IR-FT) del extracto HMM y las nanopartículas poliméricas con HMM: Con el objetivo de determinar si existían nuevas interacciones químicas entre los componentes de las NP (polímero, tensoactivo y extracto HMM) que pudieran afectar la bioactividad de las nanoformulaciones se realizó un análisis por FT-IR de los componentes y las tres nanoformulaciones (blanco y cargadas). La Figura IV.7 muestra los espectros IR obtenidos en un rango de 400 a 4,000 cm^{-1} para el PVA, los polímeros y las nanoformulaciones. En el caso del tensoactivo PVA (Figura IV.7-A) fue posible determinar la presencia de la banda ancha para un estiramiento OH (3,000 a 3,500 cm^{-1}), la cual es característica para éste compuesto (Krimm, Liang, & Sutherland, 1956). Por su parte, los polímeros biodegradables PLA y PLGA (Figuras IV.7-B y IV.7-C), al tener estructuras químicas similares, presentaron bandas correspondientes a estiramientos $\text{CH}_3/\text{CH}_2/\text{CH}$ y grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) a los 2,900-3,000 y 1,600-1,750 cm^{-1} ,

respectivamente, característicos para la preidentificación de éstos materiales (Stevanović, Radulović, Jordović, & Uskoković, 2008; Orozco, Brostow, Chonkaew, & López, 2009). Así mismo, en el EL 100-55 (Figura IV.7-D) se observaron bandas entre los 3,000 a 3,600, 2,900, 1,600 a 1,750 y 1,200 a 1,350 cm^{-1} correspondientes a la presencia de estiramientos de tipo OH, metil-metilenos, grupo carbonilo y grupo éster, respectivamente, presentes en el polímero (Hao *et al.*, 2013).

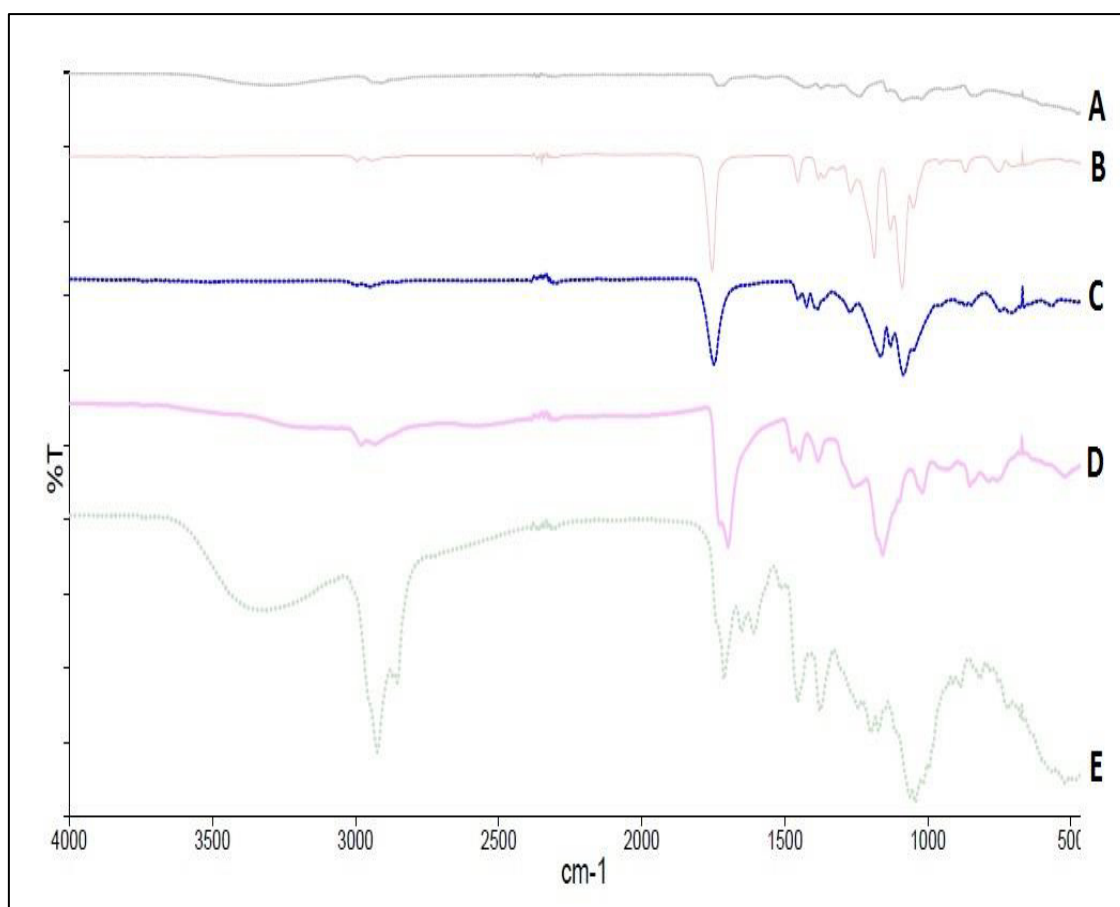


Figura IV.7. Análisis por Espectroscopía FT-IR de los materiales utilizados en las nanoformulaciones. A) PVA, B) PLA, C) PLGA, D) EL10055, E) Extracto HMM.

Particularmente, como era de esperarse el extracto HMM presentó un espectro IR muy complejo, debido a la mezcla de compuestos de distinta naturaleza química que se encuentran presentes en un producto natural como éste (Figura IV.7-E).

En el caso de las nanoformulaciones (Figura IV.8), fue posible observar bandas características para los grupos funcionales particulares tanto del polímero formador de la NP como el tensoactivo, según era el caso (formulaciones blanco y cargadas). De manera general, las NP cargadas no muestran una banda característica que indique la presencia del extracto en las nanoformulaciones. Lo anterior puede deberse a que la incorporación del extracto HMM en las NP puede llevarse a cabo de manera selectiva, es decir, que sólo algunos de los compuestos presentes en el extracto pueden estar en las NP, lo que puede provocar un enmascaramiento de bandas características (señales) por parte del polímero hacia dichos compuestos, debido a la gran diferencia de relación en masa entre el polímero y el (los) compuesto(s) nanoencapsulado(s) en las formulaciones. Por otra parte, analizando el patrón general de los espectros IR obtenidos para las nanoformulaciones se puede establecer que no existe la formación de nuevos enlaces o interacciones químicas entre los componentes de las NP (polímero y tensoactivo) y el extracto HMM.

Actividad antituberculosa del extracto HMM libre y nanoencapsulado: Con el objetivo de evaluar la actividad antituberculosa tanto del extracto HMM libre, como el incorporado en cada una de las formulaciones, se utilizó la técnica de AMBA en microplaca. Desde el inicio de éste estudio, se establecieron los 125 µg/ml como el límite máximo de CMI para considerar potencialmente activo al extracto natural. La Tabla IV.5 muestra las CMI establecidas para el extracto HMM y las formulaciones de PLA-HMM, PLGA-HMM y EL10055-HMM. Por su parte, el extracto natural HMM obtenido a partir de *S. molle* presentó una CMI de 100 µg/ml, la cual se encuentra dentro del límite que se había establecido previamente, por lo que el extracto fue considerado como potencialmente activo contra *M. tuberculosis*. Dentro de los usos etnobotánicos que se han registrado para *S. molle* se encuentra el empleo de infusiones para el tratamiento de enfermedades respiratorias, tales como bronquitis, tos, resfriado y tuberculosis (Cabieses, 2013). Considerando lo anterior, en el 2007, Molina-Salinas y col. realizaron un estudio de diversas plantas del noreste de México, dónde se estableció para extractos hexánicos del fruto de *S. molle* una CMI de 125 y 62.5 µg/ml contra *M. tuberculosis* cepa ATCC 27294

(sensible) y *M. tuberculosis* cepa multidrogorresistente (aislado clínico), respectivamente (Molina-Salinas *et al.*, 2007).

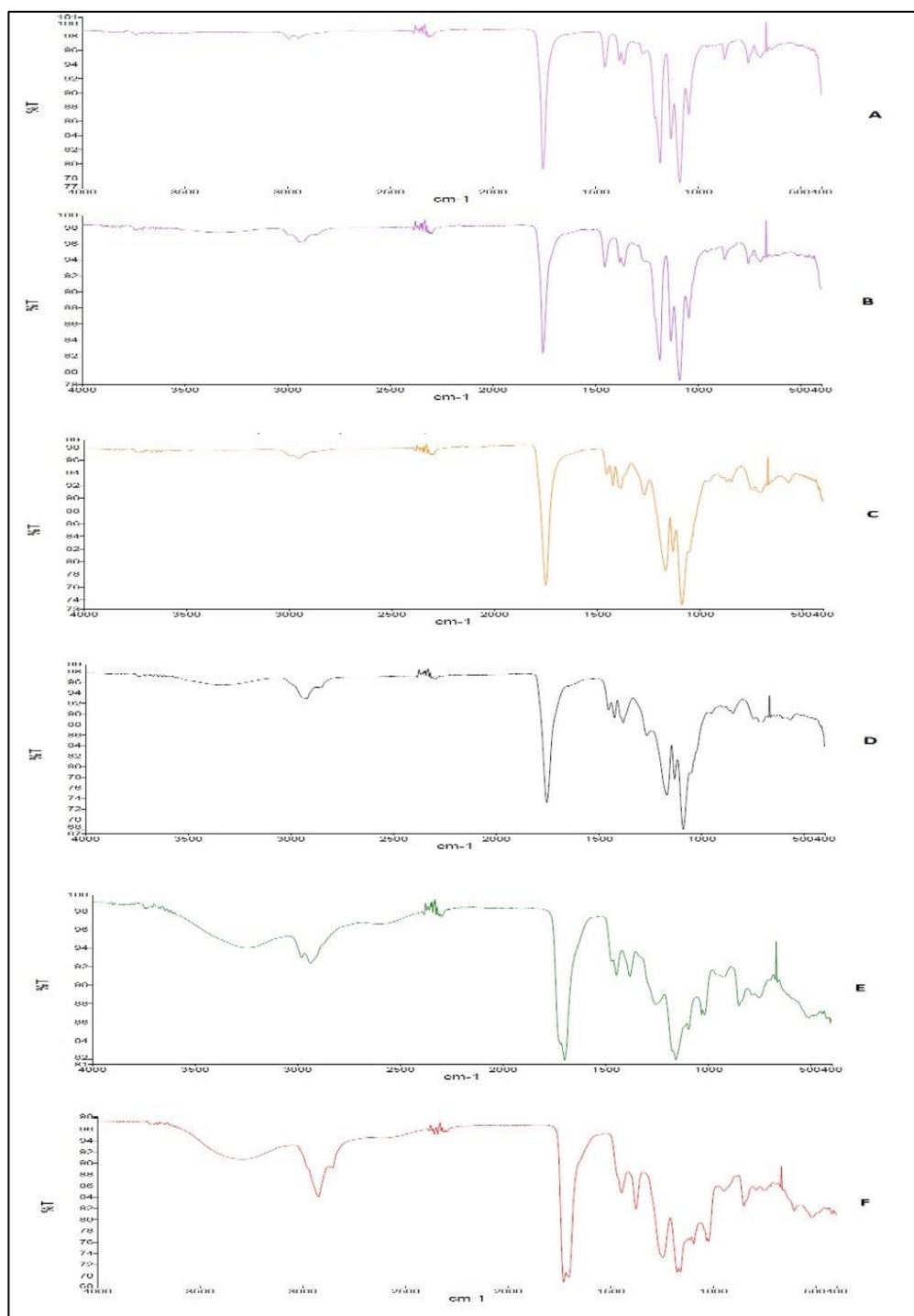


Figura IV.8. Análisis por Espectroscopía FT-IR de las nanoformulaciones. A) NP PLA blanco, B) NP PLA-HMM, C) NP PLGA blanco, D) NP PLGA-HMM, E) NP EL10055 blanco, F) NP EL10055-HMM.

Estos resultados concuerdan con la CMI obtenida para el extracto HMM (100 µg/ml). Particularmente, los extractos de plantas obtenidos con un solvente de alta polaridad como el metanol tienden a permitir la extracción y concentración de compuestos químicos con polaridad similar, es decir, solubles en agua o solventes polares, tales como los polifenoles (flavonoides, flavonas, quinonas, antiocianinas, entre otros) (Kähkönen *et al.*, 1999). Cómo se mencionó, durante la preidentificación fitoquímica del extracto HMM se constató la presencia de compuestos polifenólicos (Tabla IV.2), los cuales se destacan por presentar actividad antimicrobiana, por lo que, la actividad antimicobacteriana (contra *M. tuberculosis H7Rv*) que presentó el extracto HMM durante los ensayos *in vitro* puede ser atribuída a la presencia de los polifenoles, sin embargo, para confirmar ésta hipótesis es necesario el aislamiento e identificación de los compuestos presentes en este extracto. Así, los resultados obtenidos con el extracto HMM libre mostraron el potencial terapéutico que tienen los extractos naturales obtenidos a partir de *S. molle* como tratamiento de la tuberculosis.

Tabla IV.5. Actividad antituberculosa del extracto HMM y las nanoformulaciones por técnica de AMBA en microplaca contra *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

Formulación	Muestra	CMI (µg/ml)
Extracto HMM	Libre	100
PLA	NP blanco	Negativo
	NP-HMM	23.19 ± 5.24
PLGA	NP blanco	Negativo
	NP-HMM	30.67 ± 6.65
EL 100-55	NP blanco	Negativo
	NP-HMM	44.50 ± 15.38

(n=5, $\bar{x} \pm DS$)

Posteriormente, una vez que se estableció la CMI del extracto HMM libre se probaron las tres formulaciones elaboradas con los polímeros biodegradables (PLA-HMM y PLGA-HMM) y el metacrilato (EL10055-HMM). Como puede observarse en la Tabla IV.5, se

realizó una prueba con NP blanco (sin extracto HMM) de cada uno de los polímeros para confirmar la inactividad de los componentes del sistema de liberación y así, poder correlacionar la actividad antituberculosa de las formulaciones, exclusivamente, con la actividad del extracto HMM incorporado. Las pruebas mostraron que ninguna de las tres formulaciones tenía actividad antituberculosa. Por su parte, las tres nanoformulaciones con extracto HMM mostraron mejorar la actividad antituberculosa en comparación con el extracto HMM libre. Particularmente, la CMI obtenida para las formulaciones de PLA, PLGA y EL10055 fue de 23.19 ± 5.24 , 30.67 ± 6.65 y 44.50 ± 15.38 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, siendo la formulación con PLA la que presentó mejor actividad, disminuyendo casi 5 veces la CMI registrada para el extracto HMM libre (100 $\mu\text{g/ml}$). De manera general, este incremento en la actividad antituberculosa del extracto HMM nanoencapsulado puede atribuirse a las principales características fisicoquímicas que poseen las NP, mismas que le confieren ventajas sobre otros sistemas de liberación particulados (p.e. liposomas o micropartículas) (Armendáriz-Barragán, Álvarez-Román, & Galindo-Rodríguez, 2016). Por un lado, el tamaño de partícula preestablecido (200 nm) para las formulaciones pudo favorecer la internalización de las NP por parte de la bacteria y así, permitir una mayor acumulación intracelular del extracto HMM, mismo fenómeno que posiblemente estuvo limitado cuando se probó el extracto HMM libre. Además, las diferentes composiciones poliméricas de las nanopartículas elaboradas favorecieron la biointeracción entre el extracto HMM y la micobacteria. Finalmente, el período de incubación de la prueba (5 días) pudo dar lugar a una liberación paulatina del extracto, favoreciendo el contacto prolongado entre el activo y *M. tuberculosis*.

Particularmente, las formulaciones elaboradas a partir de los polímeros biodegradables (PLA-HMM y PLGA-HMM) destacaron por aumentar en mayor medida la actividad antituberculosa del extracto con CMI de 23.19 ± 5.24 , 30.67 ± 6.65 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Se sabe que *M. tuberculosis* es una bacteria que necesita un pH ácido para desarrollarse, por lo que el medio Middlebrook utilizado tiene un valor de pH de 6.6 en la preparación final (BD Becton, Dickinson and Company, 2012). Por su parte, es conocido que los polímeros PLA y PLGA tienen como pH óptimo para su degradación un valor ligeramente ácido (Van Nostrum, Veldhuis, Bos, & Hennink, 2004). En conjunto, las condiciones específicas que requiere la micobacteria para su crecimiento pudieron

favorecer la degradación/liberación del HMM a partir de las NP y así, aumentar la cantidad de extracto que se encontraba en contacto con la micobacteria, además de prolongar el tiempo de exposición entre los mismos (extracto y bacteria), favoreciendo la actividad antituberculosa del activo incorporado. Potencialmente, se esperaría que un proceso similar también se dé a lugar dentro de los macrófagos alveolares, células que tienen la capacidad de fagocitar NP y en las que la *M. tuberculosis* reside una vez que comienza la etapa de formación de granulomas como parte de la patología de la tuberculosis pulmonar avanzada (García-Sancho, 2001), favoreciendo la acumulación de partículas y por ende la actividad antituberculosa del extracto HMM *in vivo*, sin embargo, otro tipo de estudios más específicos son necesarios para confirmar ésta hipótesis.

Por su parte, aunque fue mayor al libre, la formulación EL10055-HMM presentó una disminución en la actividad antituberculosa (CMI=44.50±15.38 µg/ml) en comparación con las formulaciones de polímeros biodegradables, PLA-HMM y PLGA-HMM. Éste hecho puede deberse a que las condiciones para el crecimiento de la bacteria inducen un efecto sobre la interacción del nanosistema cargado de HMM y el microorganismo. El metacrilato EL10055 es un polímero que comienza a liberar activos a partir de un pH de 5.5 (relajación de cadenas poliméricas) (Meenakshi Joshi, 2013), por lo que, al tener un pH ácido en el medio de cultivo durante la incubación de la prueba biológica, la relajación de las cadenas que componían el sistema nanoparticulado fue limitada, por lo que se requirió una mayor cantidad de extracto HMM para lograr la inhibición en el crecimiento de la micobacteria, lo cual se vio reflejado en el aumento de la CMI para ésta formulación. Potencialmente, la formulación EL10055-HMM fue diseñada para una aplicación vía oral, la cual, en primera estancia, debe resistir el pH ácido del estómago para que las NP lleguen intactas al duodeno (pH básico) y ahí comience la liberación del extracto, el cual se absorbería a través del epitelio intestinal al torrente sanguíneo, donde llegaría a establecer contacto con la micobacteria libre o presente en otros órganos como pulmones, hígado, bazo, etc.

En conjunto, los resultados obtenidos durante los ensayos biológicos con *M. tuberculosis* muestran el gran potencial que tienen las tres nanoformulaciones desarrolladas para ser utilizadas como coadyuvantes en el tratamiento de la tuberculosis. El hecho de tener tres

formulaciones basadas en un sistema de liberación controlada, como las NP, con extracto natural incorporado, libre de solventes tóxicos y en cantidad suficiente (porcentaje de encapsulación) para aumentar la capacidad antimicrobacteriana del activo libre, representa un avance importante en el desarrollo y potencial aplicación de formulaciones basadas en productos naturales, lo cual permite establecer las bases para una aplicación de estos vectores con extractos vegetales contra la TB y otros patógenos.

Pruebas de liberación in vitro del HMM incorporado en las nanopartículas poliméricas.

Una parte importante del desarrollo de formulaciones farmacéuticas es el estudio del comportamiento y la manera de liberación del activo a partir de su sistema de dosificación (Soppimath, Aminabhavi, Kulkarni, & Rudzinski, 2001). Particularmente, estudiar los perfiles de liberación *in vitro* permiten establecer y extrapolar los diversos mecanismos fisicoquímicos que, en una aplicación *in vivo*, influyen en el comportamiento del extracto que se administre a través de las NP. Así, se realizaron pruebas *in vitro* con el fin de establecer el perfil de liberación del extracto HMM en las nanoformulaciones. La Figura IV.9 muestra el porcentaje de HMM liberado en función del tiempo.

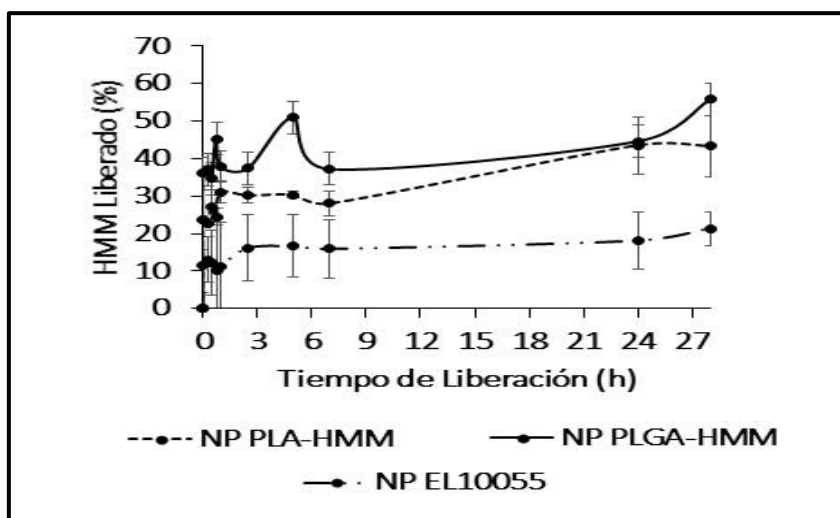


Figura IV.9. Perfil de liberación para las nanoformulaciones cargadas (Durante 28 h.) ($n=2; \bar{n} \pm DS$).

En el perfil podemos observar una primera etapa de liberación rápida con un marcado efecto burst. Éste tipo de liberación puede atribuirse a la liberación inmediata de los

compuestos del extracto que se encuentran adsorbidos en el sistema particulado, o bien, aquellos que se encuentran en las capas más superficiales de la NP (Hasan *et al.*, 2007; Huang & Brazel, 2001). En el caso de los polímeros biodegradables la primera etapa de liberación estuvo determinada por procesos de difusión simple de las moléculas de activo a través de la red polimérica. La segunda etapa de liberación que podemos observar en el perfil (a partir de las 2.5-3 h) muestra un proceso más lento y paulatino, es decir una liberación más controlada. El proceso de liberación posiblemente está determinado por procesos fisicoquímicos más complejos que se dan en la matriz polimérica, como lo es la degradación y erosión propias del polímero. Mientras la degradación del polímero se lleva a cabo, la liberación de las moléculas de HMM se llevó a cabo de manera paulatina, debido a que estos procesos fisicoquímicos no son inmediatos, sino que se dan en períodos prolongados de tiempo (Fig. IV.10) (Fredenberg, Wahlgren, Reslow, & Axelsson, 2011).

Determinación de la citotoxicidad in vitro del extracto HMM libre y nanoencapsulado:

Con la intención de estudiar la interacción y posible toxicidad de las nanoformulaciones con células humanas, se realizó un ensayo de citotoxicidad por medio de la determinación de hemólisis inducida en eritrocitos humanos. La Figura IV.11 muestra los resultados del ensayo en el que el extracto libre se probó en un rango de concentración de 50 a 500 ppm, mostrando una citotoxicidad del 100 % a partir de las 200 ppm. Por su parte, de manera general, las tres nanoformulaciones de HMM mostraron disminuir significativamente la citotoxicidad, registrando el 100 % de este índice a partir de las 400 ppm. Particularmente, la formulación de PLGA mostró un mayor índice citotóxico inicial (56.03 % a las 200 ppm) en comparación con las formulaciones de PLA y EL 100-55 (54.08 y 52.76 % a la misma concentración, respectivamente). Además, cuando se probaron formulaciones blanco (sin extracto incorporado), éstas presentaron nula citotoxicidad. La disminución en la citotoxicidad por parte de las nanoformulaciones en comparación con el extracto libre, puede atribuirse a la liberación gradual de los componentes del extracto desde la NP.

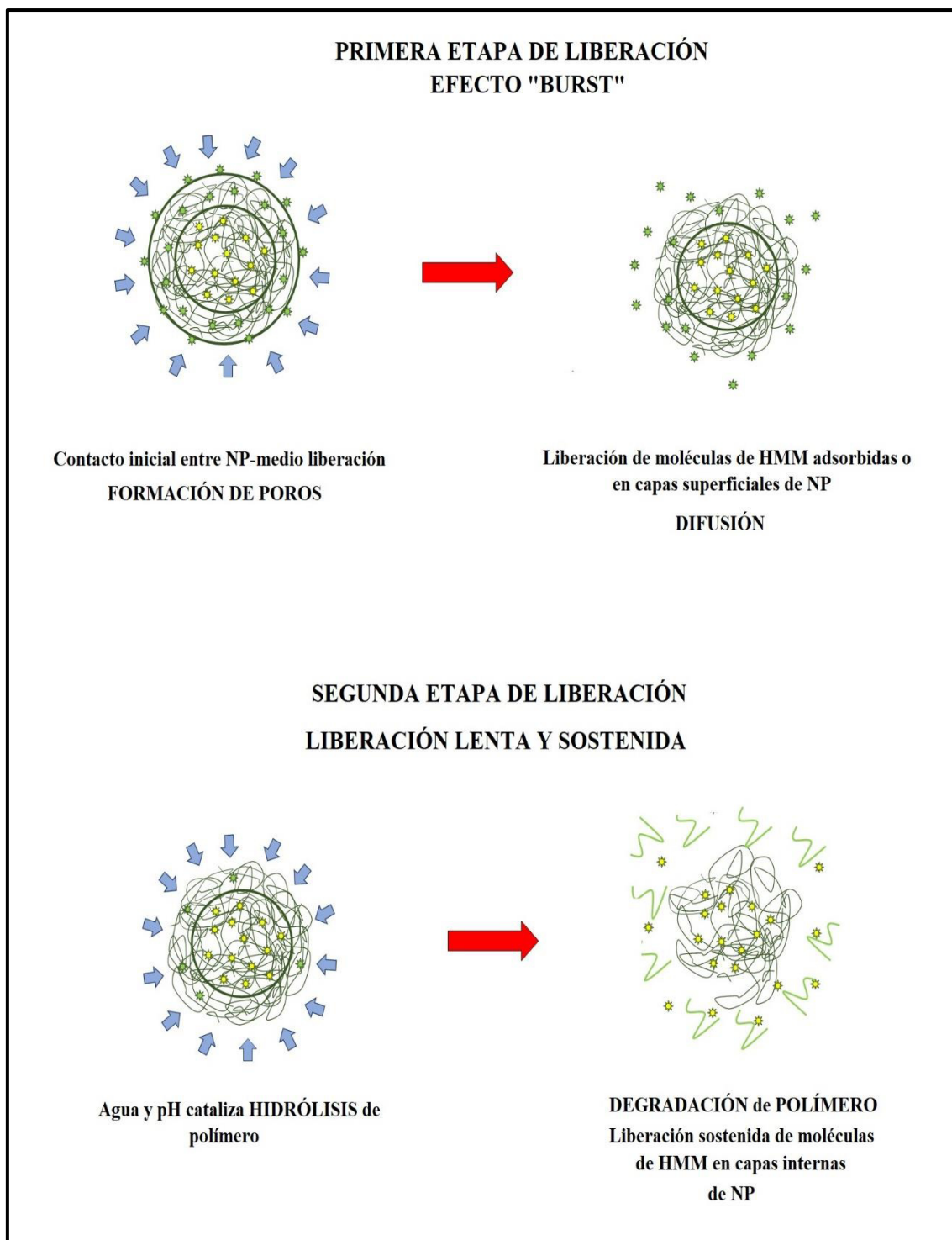


Figura IV.10. Esquema representativo de la liberación de extracto HMM a partir de las nanoformulaciones elaboradas.

La incorporación de extracto en las NP preparadas con materiales biocompatibles y que controlan su liberación, permite, de primera instancia, que el activo interactúe con la célula

de manera menos directa que en el caso del extracto libre, dónde el contacto entre activo-célula es inmediato. Estos resultados sugieren que las nanoformulaciones incrementan la biocompatibilidad del extracto HMM con células humanas, lo que favorecería aún más su potencial administración como tratamiento en el humano.

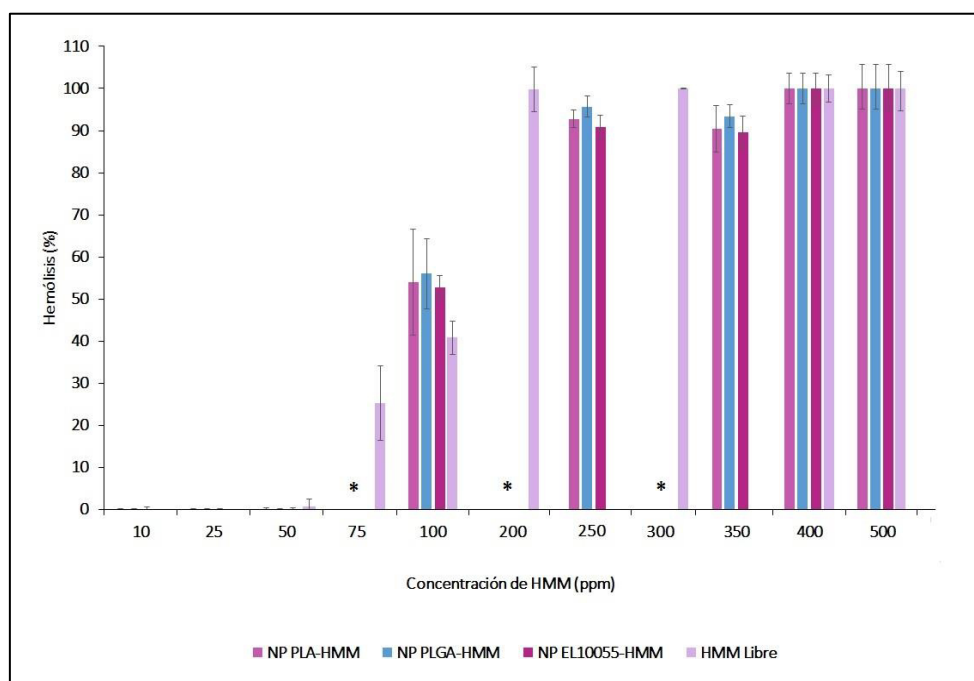


Figura IV.11. Porcentaje de citotoxicidad del extracto HMM libre y nanoencapsulado por hemólisis inducida con eritrocitos humanos ($n=3$, $\bar{x} \pm DS$).

Determinación de citotoxicidad del extracto HMM y las nanopartículas poliméricas cargadas por bioensayo con Artemia salina. Con el objetivo de ampliar el perfil toxicológico del extracto libre y las nanoformulaciones elaboradas, se realizó otro bioensayo de toxicidad con un organismo, la *Artemia salina*. A partir de un análisis estadístico Probit se determinó la Concentración Letal Media (CL_{50}) tanto para el extracto libre como para las tres nanoformulaciones. Los resultados se muestran en la Tabla IV.6. Para el extracto HMM se determinó una CL_{50} de 35 ppm, mientras que para las nanoformulaciones los valores fueron de 178.30, 111.20 y 75.58 ppm para las NP de PLA, PLGA y EL 100-55, respectivamente.

Tabla IV.6. Determinación de CL₅₀ por bioensayo con *Artemia salina* para el extracto HMM libre y las nanoformulaciones.

Formulación	Muestra	CL ₅₀ (ppm)
Extracto HMM	Libre	35
NP	PLA-HMM	178.30
	PLGA-HMM	11.20
	EL10055-HMM	75.58

(n=3, \bar{x})

Al igual que otros estudios toxicológicos, éstos resultados muestran que la nanoencapsulación de un extracto natural (como el HMM) disminuye potencialmente la toxicidad que éste presenta frente a un organismo de manera libre (de 2 hasta 5 veces) (Dhamodharan & Mirunalini, 2013; Yen, Wu, Lin, Cham & Lin, 2008). Los resultados coinciden con la tendencia que se presentó en el bioensayo de citotoxicidad con eritrocitos humanos. Es evidente que la nanoencapsulación del extracto HMM con polímeros de diversa naturaleza (biodegradables y metacrilatos) disminuye considerablemente la toxicidad del extracto, lo cual, puede ser atribuido, nuevamente, a la biocompatibilidad que los sistemas particulados presentan, permitiendo una interacción e incorporación menos agresiva con un organismo, al no permitir un contacto rápido entre el extracto y la *A. salina*, sino más bien de manera paulatina y gradual, lo cual también puede ser correlacionado con el perfil controlado de liberación del activo a partir de las NP. Con esto, las nanoformulaciones desarrolladas en este trabajo no sólo presentan características fisicoquímicas adecuadas, actividad antituberculosa eficiente, sino también son potencialmente seguras para su posterior aplicación en sistemas de estudio *in vivo* más avanzados o en el humano mismo.

IV.5 Conclusiones

La TB es una infección que actualmente presenta alta incidencia y muertes a nivel mundial. Dentro de las estrategias que ayuden a su control destacan el empleo de nuevos

sistemas de liberación de activos y obtención de productos naturales a partir de plantas que se empleen en los esquemas terapéuticos del tratamiento. Se desarrollaron tres formulaciones a base de NP y extracto metanólico de *S. molle* incorporado. Las formulaciones elaboradas con polímeros biodegradables, PLA y PLGA, mostraron un tamaño alrededor de los 200 nm y características fisicoquímicas adecuadas para su evaluación *in vitro* contra *M. tuberculosis*. Con eficiencias de encapsulación de 33-35% y debido a las propiedades fisicoquímicas que presentan las NP como sistemas de liberación controlada, estas formulaciones mostraron aumentar de 2 a 4 veces más la actividad antituberculosa que presentó el extracto HMM de manera libre. Además, las formulaciones demostraron disminuir la toxicidad frente del extracto HMM frente a eritrocitos humanos y el organismo *A. salina*, registrando menor índice de citotoxicidad y CL₅₀ inferior a la registrada con el extracto HMM libre.

Por su parte, la nanoformulación con EL 100-55 fue desarrollada con el objetivo de aplicar el extracto por vía oral. Las NP mostraron características ideales para su evaluación *in vitro* contra *M. tuberculosis*. Un tamaño alrededor de los 200 nm, una eficiencia de encapsulación cerca del 45% y un perfil de liberación sostenido del activo, permitió aumentar la actividad antituberculosa y disminuir la toxicidad en células humanas (eritrocitos) y el organismo *A. salina* del extracto HMM incorporado en la formulación.

En conjunto, los resultados muestran que las tres formulaciones desarrolladas con polímeros de diversa naturaleza química (biodegradables y metacrilato) tienen un gran potencial para ser utilizadas dentro de un esquema terapéutico como coadyuvantes en el tratamiento de la TB.

REFERENCIAS

- Augusti-Boligon A, Linde-Athayde M. 2014. Importance of HPLC in analysis of plants extracts. *Austin Chromatography*, 1(3), 2.
- Anbinder PS, Deladino L, Navarro AS, Amalvy JI, Martino MN. 2011. Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: Interactions between active compound encapsulation polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 01(04), 80–87.
- Armendáriz-Barragán B, Álvarez-Román R, Galindo-Rodríguez SA. 2016. Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro- y nanoparticulados. In *Investigación en Plantas de Importancia Médica* (Primera, Vol. 0, pp. 411–436). Omnia Science.
- Armendáriz-Barragán B, Zafar N, Badri W, Galindo-Rodríguez SA, Kabbaj D, Fessi H, Elaissari A. 2016. Plant extracts: from encapsulation to application. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(8), 1165–1175.
- Azwanida NN. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 4(3):196.
- BD Becton Dickinson and Company. (2012, September). BD Middlebrook 7H10 Agar. Consultado en <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8796>
- Bonifácio BV, da Silva PB, Ramos MADS, Negri KMS, Bauab TM, Chorilli M. 2014. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1–15.
- De Mendonça Rocha PM, Rodilla JM, Díez D, Elder H, Guala MS, Silva LA, Pombo EB. 2012. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules*, 17(10), 12023–12036.
- De Moraes Porto ICC. (2012). Chapter 3: Polymer Biocompatibility. In *"Polymers"*. Ailton de Souza Gomes (Ed.), Septiembre 2012. INTECH.
- Dhamodharan G, Mirunalini S. 2013. A detail study of phytochemical screening, antioxidant potential and acute toxicity of *Agaricus bisporus* extract and its chitosan loaded nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research*, 6(8), 818–822.
- Cabieses F. 2013. Apuntes sobre Medicina Tradicional de Fernando Cabieses. México (1920), Perú (Primera edición 1993): Diselpesa. Consultado en

<https://peregrinadanza.wordpress.com/2013/05/24/para-descargar-apuntes-sobre-medicina-tradicional-de-fernando-cabieses-1993/>

- Clemens DL, Lee BY, Courtney T, Huang M, Ferris D, Nel AE, Zink JI, Horwitz MA. 2012. Targeted intracellular delivery of antituberculosis drugs to *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages via functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2535-2545.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1–R4.
- Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1–2), 34–52.
- Galindo-Rodriguez SA, Allémann E, Fessi H, Doelker E. 2004. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439.
- García-Sancho Figueroa MCE. 2001. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revision de la liteartura. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 14(2), 114–128.
- Hao S, Wang Y, Wang B, Deng J, Liu X, Liu J. 2013. Rapid preparation of pH-sensitive polymeric nanoparticle with high loading capacity using electrospray for oral drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 33(8), 4562–4567.
- Hasan AS, Socha M, Lamprecht A, Ghazouani FE, Sapin A, Hoffman M, Ubrich N. 2007. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International Journal of Pharmaceutics*, 344(1–2), 53–61.
- Huang X, Brazel CS. 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2–3), 121–136.
- Ibrahim B, Al-Naser Z. 2014. Analysis of fruits *Schinus molle* extractions and the efficacy. *International Journal of ChemTech Research*, 6(5), 2799–2806.

- Jia D, Barwal I, Thakur S, Yadav SC. 2015. Methodology to nanoencapsulate hepatoprotective components from *Picrorhiza kurroa* as food supplement. *Food Bioscience*, 9, 28–35.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954–3962.
- Krimm S, Liang CY, Sutherland GBBM. 1956. Infrared spectra of high polymers. V. Polyvinyl alcohol. *Journal of Polymer Science*, 22(101), 227–247.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020–6047.
- Lim YH, Tiemann KM, Hunstad DA, Elsabahy M, Wooley KL. 2016. Polymeric nanoparticles in development for treatment of pulmonary infectious diseases. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(6), 842–871.
- López A, Castro S, Andina MJ, Ures X, Munguía B, Llabot JM, Domínguez L. 2014. Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 53, 209–216.
- Luque-Alcaraz AG, Cortez-Rocha MO, Velázquez-Contreras CA, Acosta-Silva AL, Santacruz-Ortega H del C, Burgos-Hernández A, Plascencia-Jatomea M. 2016. Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle*) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores. *Journal of Nanomaterials*, 2016, e6060137.
- Mailänder V, Landfester K. 2009. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*, 10(9), 2379–2400.
- Makadia HK, Siegel SJ. 2011. Poly lactic-*co*-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397.
- Mandal TK, Bostanian LA, Graves RA, Chapman SR, Womack I. 2002. Development of biodegradable microcapsules as carrier for oral controlled delivery of amifostine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(3), 339–344.
- Martins N, Barros L, Ferreira ICFR. 2016. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 1–12.

- Meenakshi J. 2013. Role of eudragit in targeted drug delivery. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 5(2), 58–62.
- Mishra B, Patel BB, Tiwari S. 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), 9–24.
- Molina-Salinas GM, Pérez-López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernández S, de Torres NW. 2007. Evaluation of the flora of Northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 435–441.
- Nasiruddin M, Neyaz MK, Das S. 2017. Nanotechnology-Based approach in tuberculosis treatment. *Tuberculosis Research and Treatment*, 2017, e4920209.
- Newton SM, Lau C, Wright CW. 2000. A review of antimycobacterial natural products. *Phytotherapy Research: PTR*, 14(5), 303–322.
- Odeh F, Al-Jaber H, Khater D. 2014. Nanoflora — How nanotechnology enhanced the use of active phytochemicals. In *Application of Nanotechnology in Drug Delivery* (pp. 343–368). INTECH. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery/nanoflora-how-nanotechnology-enhanced-the-use-of-active-phytochemicals>
- Okunade AL, Elvin-Lewis MPF, Lewis WH. 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*, 65(2004):1017-1032.
- Orozco VH, Brostow W, Chonkaew W, López BL. 2009. Preparation and characterization of poly(lactic acid)-g-maleic anhydride + starch blends. *Macromolecular Symposium*, 277, 69–80.
- Pereira MC, Hill LE, Zambiasi RC, Mertens-Talcott S, Talcott S, Gomes CL. 2015. Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: Guabiroba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) study. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 100–107.

- Renuka RSP. 2013. Design of polymeric nanoparticles of *Emblica officinalis* extracts and study of in vitro therapeutic effects. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 7(3).
- Schubert S, Delaney JT, Schubert US. 2011. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter*, 7(5), 1581–1588.
- Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 5.
- Song KC, Lee HS, Choung IY, Cho KI, Ahn Y, Choi EJ. 2006. The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 276(1–3), 162–167.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(1-2), 1-20.
- Stevanović M, Radulović A, Jordović B, Uskoković D. 2008. Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the sustained release of folic acid. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 4(3), 349–358.
- Swarnali Islam. 2011. Lipophilic and hydrophilic drug loaded PLA/PLGA *in situ* implants: Studies on thermal behavior of drug & polymer and observation of parameters influencing drug burst release with corresponding effects on loading efficiency & morphology of implants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 181–188.
- Tapan Parikh, Gupta SS, Meena A, Serajuddin ATM. 2014. Investigation of thermal and viscoelastic properties of polymers relevant to hot melt extrusion, III: polymethacrylates and polymethacrylic acid based polymers. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 5(1), 56–64.
- Tokiwa Y, Calabia BP. 2006. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 244–251.
- Van Nostrum CF, Veldhuis TFJ, Bos GW, Hennink WE. 2004. Hydrolytic degradation of oligo(lactic acid): a kinetic and mechanistic study. *Polymer*, 45(20), 6779–6787.

- Von Linné C. 1753. Species plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas / Caroli Linnæe. (Vol. t.1 (1753)). Berlin : Junk,. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/84235>
- World Health Organization. 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. Weekly Epidemiological Record. 81(45):430-432.
- World Health Organization. 2016. Global Tuberculosis Report 2016. World Health Organization. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>
- World Health Organization. 2017. What is multidrug-resistant tuberculosis and how do we control it?. World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/79/en/>
- Yen FL, Wu TH, Lin LT, Cham TM, Lin CC. 2008. Nanoparticles formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Food and Chemical Toxicology, 46(5), 1771–1777.
- Zorzi GK, Carvalho ELS, Von Poser GL, Teixeira HF. 2015. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. Revista Brasileira de Farmacognosia, 25(4), 426–436.

CAPÍTULO V:

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Dentro del marco de la búsqueda de nuevos tratamientos que permitan aumentar la eficiencia del combate contra la TB, en este trabajo se diseñaron y desarrollaron cuatro nanoformulaciones, las cuales fueron caracterizadas fisicoquímicamente y evaluada su actividad antimicrobiana contra *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*.

Se obtuvo una nanomedicina a partir de NP cargadas con el fármaco de segunda línea, clofazimina. Debido a su tamaño alrededor de 200 nm, su eficiencia de encapsulación (alredor de 63%) y su perfil de liberación sostenido del activo mostrado bajo condiciones *in vitro*, esta formulación logró disminuir la CMI de la CFM incorporada en comparación con la registrada para el fármaco libre. Además, la nanomedicina presentó alta estabilidad bajo condiciones de almacenamiento hasta por dos años. Éstos resultados establecen las bases para que dicha formulación pueda ser utilizada dentro de un esquema terapéutico de la TB.

Por su parte, las tres nanoformulaciones desarrolladas a partir del extracto de *S. molle* incorporado en NP fueron elaboradas para la potencial aplicación del activo por vía intravenosa, para el caso de las NP elaboradas con polímeros biodegradables (con PLA y PLGA) y para una aplicación oral del extracto, en el caso de las NP elaboradas con metacrilato (EL 100-55). Las nanoformulaciones mostraron características fisicoquímicas importantes. Con un tamaño de 200 nm, una eficiencia de encapsulación del 33-45% y un perfil de liberación sostenido del extracto *in vitro*, las nanoformulaciones fueron capaces no sólo de mejorar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de 2 a 4 veces más contra *M. tuberculosis* H37Rv, sino también disminuir la toxicidad del activo cuando se probaron *in vivo* (bioensayo con *A. salina*) e *in vitro* (con RBC humanos). Con estos resultados es posible establecer el gran potencial que tienen estas formulaciones para aplicar extractos naturales con actividad antituberculosa como coadyuvantes dentro de los esquemas de tratamiento de la TB.

CAPÍTULO VI:

PERPECTIVAS DEL TRABAJO

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- Es recomendable realizar el fraccionamiento biodirigido e identificación de los compuestos aislados que sean responsables de la actividad antituberculosa contenidos en el extracto metanólico obtenido de *Schinus molle*.
- Se sugiere realizar estudios de sinergismo microbiológico con *Mycobacterium tuberculosis* (sensible y farmacorresistente) entre los principales fármacos antituberculosos y el extracto o compuestos aislados de *Schinus molle*.
- Se puede estudiar la actividad antituberculosa *in vitro* del extracto metanólico, fracciones o compuestos aislados en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* farmacorresistentes.
- Se recomienda realizar estudios de internalización de las NP en diversos sistemas biológicos de interés (p.e. células, tejidos y órganos) para predecir el comportamiento de las nanoformulaciones dentro dichos sistemas.
- Se sugiere realizar estudios de farmacocinética en modelos *in vivo* que permitan establecer el metabolismo de absorción y eliminación del activo (fármaco o extracto), ampliar el panorama toxicológico y de dosificación de las formulaciones.

ANEXO

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

- ***Capítulo de Libro***

Armendáriz-Barragán, B., Álvarez-Román, R. & Galindo-Rodríguez, S.A. (2016). Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro- y nanopartículados. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M.A. & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona-España: Omnia Science. 411-436.

- ***Artículo en Revista Científica***

Brenda Armendáriz-Barragán, Nadiah Zafar, Waisudin Badri, Sergio Arturo Galindo-Rodríguez, Dounia Kabbaj, Hatem Fessi & Abdelhamid Elaissari (2016) Plants extracts: from extraction to application, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13:8, 1165-1175, DOI: [10.1080/17425247.2016.1182487](https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182487)

- ***Congresos Internacionales***

1. Evaluación y perfil de la capacidad antioxidante de cinco aceites esenciales. 12va. Reunión de Investigación en Productos Naturales. AMIPRONAT. Xalapa, Veracruz, México, 18-20 de Mayo 2016. (Cartel)
2. Determinación de la capacidad antioxidante de extractos metanólicos de hoja y fruto de *Schinus molle* para su potencial aplicación en humanos. 11va. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. AMIPRONAT. Sonora, México, 20-22 de Mayo 2015. (Cartel)

3. Obtención y caracterización fisicoquímica de extractos de *Schinus molle* para su potencial aplicación en el tratamiento de la tuberculosis. 10ma. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. AMIPRONAT. Yucatán, México, 21-24 de Mayo 2014. (Cartel)

- ***Congresos Nacionales***

1. Desarrollo y validación de un método analítico por CLAR-UV para cuantificar clofazimina en nanopartículas poliméricas biodegradables. XXVIII Congreso Nacional. AMQA. Guerrero, México, 24-27 de Junio 2015. (Cartel)

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Brenda Armendáriz Barragán

Candidata al Grado de

Doctora en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: NANOMEDICINAS A BASE DE PRODUCTOS NATURALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS.

Campo de Estudio: Nanotecnología Aplicada a las Ciencias de la Salud.

Datos Personales: Nacida el 06 de mayo de 1987 en San Luis Potosí, S.L.P., hija de Felipe de J. Armendáriz Esparza (+) y Olga Barragán Álvarez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2012 con la elaboración de Tesis titulada “Preparación y evaluación *in vitro* de la actividad antituberculosa de nanopartículas poliméricas biodegradables cargadas con clofazimina”.

Experiencia Profesional: Investigación en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas desde 2012 y Profesora Asistente en la asignación de Análisis Instrumental (100% práctica; 50% teórico).